

Aus dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Die Beeinflussung der β -Amyloid-Belastung in einem transgenen Mausmodell des Morbus Alzheimer durch Borna-Disease-Virus (BDV)-induzierte Inflammation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Christine Reimers
aus Winsen/Luhe

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Seeger, Veterinär-Anatomisches Institut, Leipzig
Prof. Dr. Reinhard Schliebs, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Leipzig
Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D., Institut für Pathologie der Tier-
ärztlichen Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 06. Mai 2008

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC-Komplex	Streptavidin-Biotin-Komplex
Ac	Saure Domäne
ACT	Antichymotrypsin
AD	Alzheimer`s Disease, Alzheimersche Krankheit
AEA	Arachydonethanolamin
AEBSF	4-2-Aminoethylbenzensulfonylfluorid
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APOE 4	Apolipoprotein E-Allel ϵ 4
APP	Amyloid precursor protein; Amyloid-Vorläuferprotein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
A2M	Proteaseinhibitor α 2-Makroglobulin
BACE	Beta-site APP cleaving enzyme
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDV-D	Borna-Disease-Virus-Disease
β A ₁₋₄₀ / ₁₋₄₂	Beta-Amyloid-Peptid; der Index nennt die Länge der Aminosäuresequenz
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA1, 2 und 3	Cornu ammonis, Ammonshorn-Regionen 1, 2 und 3 des Hippokampus
C83	APP-Peptid, das nach α -Sekretase-Aktivität in das p3-Peptid aufgespalten wird
Cb	Cerebellum
CD ₄ / CD ₈	Cluster of differentiation
C99	APP-Peptid, das nach β - und γ -Aktivität in das β A-Peptid aufgespalten wird
Co	Kortex
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EOAD	Early onset Alzheimer`s Disease; früh einsetzende Form der Alzheimerschen Krankheit
FAD	Familiäre, vererbte Form der Alzheimerschen Krankheit

FFU	Focus forming units
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; saures fibrilläres Gliaprotein
GSA	Griffonia simplicifolia Lektin
hAPP	human Amyloid Precursor Protein, humanes Amyloid-Vorläuferprotein
HAZAP	Hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid
Hc	Hippokampus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-sulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxamethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
HSA (21)	Chromosom (21) des Menschen (Homo sapiens sapiens)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IDE	Insulin-degrading enzyme
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-n	Interleukin-n
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
IPA	Indol-3-Propionsäure
IP-10	Interferon-gamma-inducible protein-10
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
KPI	Proteaseinhibitor-domäne vom Typ Kunitz
KT	Kontrolltier
LDL	Low density lipoprotein
LOAD	Late onset AD; spät einsetzende Form der Alzheimerschen Krankheit
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related-protein = A2M-Rezeptor
M	Molar
MAC	Membrane Attack Complex
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCSF	Macrophage-colony stimulating factor
MDC	Macrophage-derived chemokine
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage inhibitory factor = Makrophagenmigrations-Hemmfaktor
MIP-1n	Macrophage inflammatory protein-1n
MOCK	Scheininfiziert
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSR	Makrophagen-Scavenger-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NCX-2216	3-[4-(2-Fluoro- α -methyl-[1,1'-biphenyl]-4-azetyloxy)-3-methoxy-phenyl]-2-propensäure-4-nitrooxybuthylester; Flurbiprofen-Derivat
NEP	Neprilysin-Endopeptidase = Enkephalinase
NGF	Nerve Growth Factor, Nervenwachstumsfaktor
NF ₃ NT-4	Neurotrophine
NFT	Neurofibrillary tangles; neurofibrilläre Bündel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drugs; nichtsteroidale Anti-phlogistika
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
p3	Peptid, das durch α - und γ -Sekretaseaktivität aus APP prozessiert wird
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PGJ2	Prostaglandin J2
PHF	Paired helical filaments; paarige, helikal verdrehte Filamente
p.i.	post infectionem
p.n.	post natum
PrP	Prion Protein
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS1 / PS2	Präsenilin 1 / 2
p40	Nukleoprotein des Borna Disease Virus
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
ROS	Reactive oxygen species
RPA	RNAse Protection Assay
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Standard
sAPP	Sekretierter N-Terminus des APP-Moleküls
SDS	Sodium dodecylsulfate; Natriumdodecylsulfat
SORL1	Sortilin-related receptor L
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle

TACE	TNF α converting enzyme
TAE	Trisacetat / EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus-Polymerase
TBE	Trisborat / EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
tg	transgen
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Th ₁ / Th ₂	Subspezies von T-Helferzellen
Thio-S	Thioflavin-S
TLR	Toll-like receptor
TM	Transmembranregion
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜLZ	Überlebenszeit
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
UTPs	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Die Alzheimersche Krankheit	3
2.1.1	Pathomorphologie und Risikofaktoren	3
2.1.2	Pathogenese	6
2.1.2.1	APP-Prozessing	6
2.1.3	Mikroglia als residenter Makrophage des ZNS	8
2.1.3.1	Aktivierte Mikroglia im AD-Geschehen – Schädlich oder förderlich?	10
2.1.3.2	Mikroglia-vermittelte β -Amyloid-Clearance	13
2.1.4	Spezifische immunologische Prozesse	18
2.1.5	Bisherige Therapiemöglichkeiten	19
2.2	Das Borna Disease Virus (BDV)	23
2.2.1	Borna Disease Virus – eine immunvermittelte Erkrankung	24
2.2.2	Das BDV-Mausmodell	25
2.2.3	Mausstamm-spezifische Unterschiede in der Empfänglichkeit	26
3	Tiere, Material und Methoden	27
3.1	Chemikalien, Material und Geräte	27
3.1.1	Geräte und Laborhilfsmittel	27
3.1.2	Software	277
3.1.3	Virus	288
3.2	Versuchstiere	288
3.2.1	Transgenes Mausmodell	28
3.2.2	Transgen-Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.2.3	BDV-Infektion	30
3.2.4	Überlebenszeiten und Gruppengrößen	311
3.2.5	Gewebepräparation	311
3.3	Untersuchung der Hirnhälften	322
3.3.1	Immunhistochemische Untersuchung der Hirnhälften	333
3.3.1.1	Standardprotokoll für die Immunhistochemie	333
3.3.1.2	Nachweis des viralen Nukleoproteins in Astroglia mittels Doppelmarkierung	344
3.3.1.3	Lektinhistochemischer Mikroglia-Nachweis	344
3.3.1.4	Antigenwiederherstellung	344
3.3.2	Darstellung der β -Amyloid-Ablagerungen mittels Thioflavin-S	355
3.3.3	Fluoreszenz-Doppelmarkierung	35
3.3.3.1	β -Amyloid-Ablagerungen und Mikroglia	35
3.3.3.2	β -Amyloid-Ablagerungen und Astroglia	36
3.3.4	Morphometrische Auswertung	36
3.3.4.1	Dichte der BDV-infizierten Zellen	36
3.3.4.2	Klassifizierung von CD ₄ - und CD ₈ -Zellen	36
3.3.4.3	Klassifizierung der mikroglialen Aktivierung	37

3.3.4.4	Histometrische Quantifizierung der β -Amyloid ₁₋₄₂ -Markierungsdichte	37
3.3.4.5	Quantitative Auswertung der Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Ablagerungen.....	37
3.3.5	Quantifizierung von β -Amyloid-Peptiden mittels ELISA	38
3.3.5.1	Präparation der Proben.....	38
3.3.5.2	Probenmessung.....	38
3.3.6	Untersuchung der m-RNA-Expression ausgewählter Zytokine	39
3.3.6.1	RNAse Protection Assay (RPA)	39
3.3.6.2	Gel-Elektrophorese	40
3.4	Biostatistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Untersuchung der BDV-induzierten Inflammation im Gehirn von transgenen Mäusen	41
4.1.1	Immunhistochemische Untersuchungen	411
4.1.1.1	Virusnachweis und Virusverteilung in verschiedenen Hirnregionen.....	411
4.1.1.2	Beurteilung der Virus-induzierten Immunreaktion anhand der lymphozytären Infiltrationen.....	444
4.1.1.3	Charakterisierung der glialen Reaktion.....	47
4.1.2	Charakterisierung der Zytokinexpression zwei, vier und 14 Wochen nach der BDV-Infektion.....	499
4.2	Untersuchungen zur Beeinflussung der β -Amyloid-Belastung durch die BDV-induzierte Inflammation	511
4.2.1	Immunhistochemische Untersuchungen	511
4.2.1.1	Charakterisierung von Virusantigenexpression, T-Zellinfiltraten und glialer Reaktion	522
4.2.1.2	Nachweis und quantitative Analyse von β -Amyloid-Ablagerungen	622
4.2.2	Korrelationsprüfung zwischen β -Amyloid ₁₋₄₂ -Reduktion und Mikroglia-Aktivierung.....	66
4.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	67
4.2.3.1	Nachweis und quantitative Analyse der Amyloid-Ablagerungen mittels Thioflavin-S-Färbung.....	67
4.2.3.2	Immunfluoreszenz-Darstellung von Gliazellen in Kombination mit der Thioflavin-S-Färbung.....	711
4.2.4	β -Amyloid-Peptid-Quantifizierung mittels Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)	73
5	Diskussion	744
5.1	Das transgene hAPP-Mausmodell für die Alzheimersche Krankheit und Borna Disease Virus	744
5.1.1	Charakterisierung der BDV-induzierten Inflammation im ZNS.....	75
5.1.1.1	Lymphozytäre und gliale Reaktionen sowie Zytokinexpression in jungen Mäusen (Höchstalter: Vier Monate) ohne β -Amyloid-Plaque-Formation	75

5.1.1.2	Lymphozytäre und gliale Reaktionen in alternden Mäusen (11, 13,5 und 18 Monate) mit progressiver β -Amyloid-Plaque-Formation	79
5.2	BDV-induzierte Modulation der Alzheimer's Disease-Pathologie	833
5.2.1	Einfluss der BDV-induzierten Mikroglia-Aktivierung auf den β -Amyloid-Gehalt in den Gehirnen der Kontrolltiere und der BDV-infizierten Tiere	844
5.2.2	Mögliche Mechanismen der β -Amyloid-Reduktion unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Mikroglia	922
5.3	Ableitungen für potentielle therapeutische Strategien	98
6	Zusammenfassung	1011
7	Summary	1033
8	Literaturverzeichnis.....	105

Anhang

Anhang I: Antikörper, Lektine, Lösungen, Chemikalien und Puffer	VI
Anhang II: Histometrische Auswertung.....	VI
Anhang III: Statistische Datenverarbeitung und Diagramme.....	XVIIIVII

Danksagung

1 Einleitung

Bei der von Alois Alzheimer 1907 erstmals beschriebenen „eigenartigen Erkrankung der Hirnrinde“ handelt es sich um die neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die die häufigste Ursache altersbedingter Demenz darstellt – die Alzheimersche Krankheit (auch Morbus Alzheimer, Demenz vom Alzheimer-Typ, Alzheimer`s disease, AD).

Gegenwärtig wird von mehr als einer Million Demenzkranken in Deutschland ausgegangen, davon entfallen zwei Drittel auf die Alzheimer-Demenz. Entsprechend der vorausberechneten Bevölkerungsentwicklung wird die Zahl der Demenzkranken Jahr für Jahr um etwa 25.000 zunehmen und sich bis zum Jahr 2050 auf etwa 2,3 Millionen erhöhen, sofern kein Durchbruch in Prävention und Therapie gelingt (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2007).

Durch die Schädigung von Nervenzellen im Kortex und im limbischen System, insbesondere auch im Bereich des Hippokampus, kommt es zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit, wovon insbesondere Gedächtnis, Sprache, Orientierungs- und Urteilsvermögen betroffen sind. Neben Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Merkfähigkeit sind auch emotionale Störungen häufig vertreten.

Im Alzheimer-Geschehen spielt die Aktivierung von Mikrogliazellen als Hauptimmunzellen des ZNS eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Erkrankung. Diese Mikroglia-Aktivierung ist von zahlreichen Arbeitsgruppen intensiv untersucht und divergierend bewertet worden. In Abhängigkeit von Faktoren, wie Voraktivierung, Alter, Milieu, Art und Dauer des Stimulus, treten verschiedene Arten der Mikroglia-Aktivierung mit unterschiedlichen, schädlichen bis hin zu förderlichen Auswirkungen auf das neuronale Umfeld auf: So produzieren aktivierte Mikrogliazellen proinflammatorische Zyto- und Chemokine sowie zytotoxische Faktoren, wie Superoxide, Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffspezies und Exzitotoxine, die zu Neurodegeneration und Zelltod führen können (COLTON & GILBERT 1987; GIULIAN 1997; AKIYAMA et al. 2000). Allerdings sind aktivierte Mikrogliazellen auch an einer β -Amyloid-Reduktion durch Phagozytose (SCHENK et al. 1999; BARD et al. 2000; BERNHARDI & RAMIREZ 2001; D`ANDREA et al. 2004), Proteolyse (MENTLEIN et al. 1998) und β A-Abtransport (FRAUTSCHY 1992) aus dem ZNS beteiligt. Außerdem produzieren sie auch antiinflammatorische Zytokine (VAN DER WAL et al. 1993; WYSS-CORAY et al. 2001a) und neuroprotektive Mediatoren (NEUMANN et al. 1998; WEI & JONAKAIT 1999) und wirken so den entzündungsbedingten Konsequenzen entgegen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch viral induzierte, adaptive immunologische Mechanismen die mikrogliale Aktivierung zu modulieren und den Einfluss dieser Modulation auf das AD-Geschehen zu untersuchen. Dazu wurde die transgene Mauslinie Tg2576 verwendet. Dieses von Karen Hsiao entwickelte Tiermodell exprimiert eine mutierte Variante des humanen Amyloid Precursor Proteins (hAPP), die Ursache einer familiären, früh auftretenden Form von AD ist (HSIAO et al. 1996). Im Gehirn dieser Tiere werden nach acht bis zehn Monaten die für die AD typischen Plaques gefunden. Diese Tiere und Wildtyp-Geschwistertiere wurden zu unterschiedlichen Stadien der Plaqueentwicklung mit dem Borna Disease Virus (BDV) infiziert.

Bei dem Borna Disease Virus handelt es sich um ein nicht zytopathogenes, neurotropes Virus mit unsegmentiertem Minus-Strang-RNA-Genom, das nach experimenteller Infektion eine T-Zell-vermittelte Inflammation im ZNS hervorruft. Diese BDV-induzierten, immunpathologischen Reaktionen sind durch zahlreiche Tiermodelle sehr gut charakterisiert. Die von uns verwendete Mauslinie ist aufgrund ihres genetischen Hintergrundes nicht empfänglich für einen klinisch manifesten BDV-Krankheitsverlauf. In unseren Untersuchungen stellt das Borna Disease Virus daher ein Modell zur spezifischen Aktivierung von Mikrogliazellen dar, welches uns ermöglicht, die Auswirkungen einer viral induzierten Mikroglia-Aktivierung auf die zerebrale β -Amyloid-Belastung bei Morbus Alzheimer zu studieren, ohne, dass die Tiere klinisch an BDV erkranken.

Dazu wurde die viral induzierte Inflammation charakterisiert und die β -Amyloid-Belastung im Gehirn von Tieren aus drei Altersgruppen (11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate) vier Wochen nach der intrazerebralen BDV-Infektion quantitativ bestimmt und mit der β -Amyloid-Belastung in Gehirnen von nicht infizierten, transgenen Kontrollmäusen verglichen. Es sollte geklärt werden, ob es in Folge der viral induzierten Mikroglia-Aktivierung zu potentiell neuroprotektiven Effekten, wie einer β -Amyloid-Reduktion im Gehirn BDV-infizierter, transgener Mäuse kommt.

Diese Fragestellung wurde methodisch durch immunhistochemische Erfassung der T-Zellinfiltrationen und der Astroglia- und Mikroglia-Aktivierung sowie durch vergleichende, quantitative Analysen der zerebralen β -Amyloid-Belastung in den Mäusegehirnen bearbeitet. Neben der histometrischen Quantifizierung mittels βA_{1-42} -Immunhistochemie und Thioflavin-S-Markierung wurde die β -Amyloid-Belastung auch biochemisch mittels βA_{1-40} - und βA_{1-42} -ELISA bestimmt.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Alzheimersche Krankheit

Die Alzheimersche Krankheit stellt eine progressive, neurodegenerative Erkrankung des ZNS dar, in deren Verlauf es zu einem fortschreitenden Untergang von Nervenzellen und Synapsen kommt. Die Folge dieses Neuronenverlusts, der im Kortex, im limbischen System und vor allem im Hippokampus auftritt, sind Beeinträchtigungen der kognitiven Leistungsfähigkeit, des Gedächtnisses, der Sprache sowie des Orientierungs- und Urteilsvermögens. Es kommt zu Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Merkfähigkeit sowie zu emotionalen Störungen und absoluter Pflegebedürftigkeit der Betroffenen.

Die Erkrankung ist nach dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer (1864 – 1915) benannt, der die Krankheit erstmals im Jahre 1907 wissenschaftlich beschrieben hat (ALZHEIMER 1907). Sie stellt die häufigste Ursache altersbedingter Demenz dar. Gegenwärtig geht man in Deutschland unter den über 65-Jährigen von über einer Million Menschen aus, die an Demenzerkrankungen leiden; davon entfallen zwei Drittel allein auf die Alzheimersche Demenz (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT e.V. 2007).

2.1.1 Pathomorphologie und Risikofaktoren

Pathomorphologisch ist die Alzheimersche Krankheit durch das gleichzeitige Auftreten von zwei charakteristischen Läsionen gekennzeichnet: Einerseits durch extrazellulär auftretende amyloide Ablagerungen (Plaques), die bereits ALZHEIMER (1907) beschrieben hat, andererseits durch intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (intracellular neurofibrillary tangles, NFT). Es kommt des Weiteren zu einer Verminderung der kortikalen Synapsendichte einhergehend mit einem hochgradigen Neuronenverlust.

βA4-Plaques:

Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen, deren Hauptkomponente β-Amyloid-Peptide darstellen. Amyloid bezeichnet Eiweißkomplexe, die unter physiologischen Bedingungen zu unlöslichen Ablagerungen aggregieren können; diese Ablagerungen sind wie Stärke („amyloid“) mit Jod histologisch darstellbar; des Weiteren sind sie mit Kongo-Rot und Thioflavin-S anfärbbar. Die vorrangig in kortikalen und hippokampalen Hirnregionen auftretenden βA-Plaques weisen je nach Stadium der Plaqueentwicklung einen Durchmesser von 5 bis 200 µm auf. Unterschieden werden Ablagerungen löslichen Amyloids im Extrazellulärraum (= **diffuse** Plaques), die zu Beginn der Plaqueentwicklung dominieren, von später auftretenden amyloiden Ablagerungen, die mit degenerierenden Nervenfasern assoziiert sind (= **neuritische** Plaques). Einhergehend mit der Einlagerung von degenerierenden Nervenzellfortsätzen in die diffusen Plaques und damit dem Übergang zu neuritischen Plaques kommt es zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (MIYAZONO et al. 1991; WISNIEWSKI & WEIGEL 1993).

1984 gelang es GLENNER und WONG durch biochemische Analysen der neuritischen Plaques ein 4,2 kD großes Peptid zu identifizieren, das β -Faltblattstruktur aufwies – das β -Amyloid (auch A β , Peptid mit β -Faltblattstruktur, β A4). Dieses aus 39 bis 42 Aminosäuren bestehende β -Amyloid-Peptid stellt die Hauptkomponente der Plaques dar; es entsteht durch proteolytische Prozessierung eines membrangebundenen Vorläuferproteins, dem sogenannten Amyloidvorläuferprotein (**Amyloid Precursor Protein, APP**). Das APP ist ein integrales Membranprotein, das eine große extrazelluläre N-terminale Domäne, eine transmembranale Domäne sowie eine kurze intrazelluläre C-terminale Domäne aufweist (KANG et al. 1987). Es wird ubiquitär in allen Organen exprimiert (TANZI et al. 1989). Im Gehirn wird APP von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia synthetisiert (BAUER 1994). Durch posttranslationale Proteolyse von APP (KANG et al. 1987) mittels α -, β - und γ -Sekretasen (siehe 2.1.2.1) entstehen lösliche β A-Oligomere, die zu Fibrillen aggregieren können (LING et al. 2003).

Der γ -Sekretase-Komplex ist eine spezielle Form einer Aspartyl-Protease (WOLFE et al. 1999a, b; STEINER et al. 2000). Die Arbeitsgruppen um MOORE (2000) und um HERREMAN (2000) konnten zeigen, dass neben weiteren Proteinen wie Nicastrin und Kaveolinen (IKEZU et al. 1998; YU et al. 1998; LI et al. 2000; GOUTTE 2002; KAETHER et al. 2002) die Präseniline PS1 und PS2 einen wichtigen Bestandteil des γ -Sekretase-Komplexes darstellen, der intramembranal proteolytisch aktiv ist. Bei den Präsenilinen handelt es sich um Transmembranproteine mit acht Transmembrandomänen. Entdeckt wurden die Präsenilin-Gene *ps1* und *ps2* im Zusammenhang mit Mutationen auf Chromosom 14 und Chromosom 1, welche mit dem frühen Auftreten der Alzheimerschen Erkrankung (early-onset Alzheimer's Disease, EOAD) und stark erhöhten β A₄₂-Werten assoziiert sind (DUFF et al. 1996; SCHEUNER et al. 1996; CITRON et al. 1997; TOMITA et al. 1997). Eine erhöhte Konzentration von fibrillärem β A₄₂ im Vergleich zu löslichem β A₄₀ bewirkt die Entstehung der AD-typischen Plaques. Das β A₄₂ ist länger und hydrophober als die β A₄₀-Form und weist daher eine stärkere Tendenz zur Oligomerisierung und Präzipitatbildung auf (BURDICK et al. 1992; JARRETT et al. 1993; BITAN et al. 2003; CHEN & GLABE 2006). β A₄₂ ist bereits in frühen Stadien von AD in den sogenannten „diffusen“ Plaques vorhanden (YAMAGUCHI et al. 1989); aus diesen diffusen Plaques entstehen im weiteren Verlauf durch Einlagerung von β A₄₀ und fibrillärem β A₄₂ die reifen, neuropathogenen sogenannten „neuritischen“ Plaques (SELKOE 1999, 2001a), die neurotoxisch wirken und einen Nervenzelltod hervorrufen.

Neurofibrilläre Degeneration:

Die zweite charakteristische Läsion im Gehirn von AD-Patienten sind die intrazellulär auftretenden neurofibrillären Bündel (intracellular neurofibrillary tangles, NFT). Die Hauptkomponente dieser neurofibrillären Bündel sind paarige, helikal verdrehte Filamente (= paired helical filaments, PHF), die aus einer hyperphosphorylierten Form des normalerweise mit Mikrotubuli assoziierten Proteins Tau bestehen (GRUNDKE-IQBAL et al. 1986). Unter physiologischen Bedingungen liegt Tau in nicht phosphorylierter Form vor und begünstigt so die Polymerisation und Stabilisierung von Mikrotubuli. Die Hyperphosphorylierung von Tau geht mit einem Zusammenbruch des Mikrotubuli-Zytoskeletts in den Nervenzellausläufern

einher (GOEDERT et al. 1996). Daraufhin kommt es zu einer Störung intrazellulärer Transportprozesse, was schließlich zum Absterben der Zelle führt (TAKASHIMA et al. 1993; BUSCIGLIO et al. 1995). Typischerweise beginnt die neurofibrilläre Degeneration im entorhinalen Kortex und geht anschließend auf hippocampale Regionen über; der Isokortex ist erst später von den neurofibrillären Veränderungen betroffen (BRAAK & BRAAK 1991). Entsprechend der heutigen Interpretation der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (siehe 2.1.2.2) werden diese neurofibrillären Bündel als sekundäres Phänomen betrachtet, die durch veränderte Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten als Folge von Homöostase-Störungen induziert werden (HAASS & SELKOE 2007).

Risikofaktoren:

Fünf bis zehn Prozent der Alzheimer-Fälle stehen im Zusammenhang mit autosomal dominanten Mutationen und treten vor dem 65. Lebensjahr auf (früh einsetzende Form, early-onset, EOAD) (DUARA et al. 1993; SELKOE 1996); sie werden auch als Familiäre Alzheimersche Krankheitsformen (FAD) bezeichnet. Bisher sind Veränderungen auf drei verschiedenen Genorten identifiziert worden, die zu einer familiär bedingten AD führen können (GEORGE-HYSLOP et al. 1987; GOATE et al. 1991; SCHELLENBERG et al. 1993; LEVY-LAHAD 1995; HARDY et al. 1998): Es handelt sich um das auf Chromosom 21 gelegene Gen für das *app* sowie um die Gene *präsenilin 1* (*ps-1*) auf Chromosom 14 und *präsenilin 2* (*ps-2*) auf Chromosom 1, die mit der γ -Sekretase-Spaltung des APP assoziiert sind.

Lediglich die schwedische APP-Mutation bewirkt durch eine gesteigerte β -Sekretase-Spaltung eine erhöhte β -Amyloid-Produktion, während alle anderen bekannten Mutationen durch Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität das Verhältnis $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ erhöhen und somit zu einer Zunahme des neurotoxischen βA_{42} führen (SELKOE 2001a).

Die große Mehrheit (90 bis 95 %) der Alzheimer Erkrankungen treten nach dem 65. Lebensjahr spontan und progressiv verlaufend auf und werden als spät einsetzende (late onset, LOAD) Alzheimer-Form bezeichnet. Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit ist somit das Alter. So beträgt die Wahrscheinlichkeit zu erkranken für 65-74 jährige Personen ca. 2 %, für 75-84 Jährige ca. 12 % und für Personen über 84 Jahre etwa 50 % (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2007). Auch die spät einsetzende Form der AD ist teilweise mit bestimmten Genen assoziiert, die alleine als Ursache nicht ausreichen, sondern nur in Zusammenwirkung mit verschiedenen weiteren Risikofaktoren die Gefahr, an AD zu erkranken, erhöhen. Neben dem Alter zählen zu diesen Risikofaktoren beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen, geringer Bildungsstand, Diabetes sowie möglicherweise auch Toxine oder traumatische Ereignisse, wie Kopfverletzungen (MAYEUX et al. 1995).

Eines dieser Suszeptibilitätsgene stellt das auf Chromosom 19 lokalisierte *apolipoprotein E*-Gen (*apoE*) dar, dessen Proteine physiologischerweise am Transport und Metabolismus von Lipiden beteiligt sind. Von diesem Gen sind drei verschiedene Allele bekannt, die als $\epsilon 2$ -, $\epsilon 3$ - und $\epsilon 4$ -Allele bezeichnet werden. Träger des $\epsilon 4$ -Allels gelten als Risikogruppe für die Ausbildung der familiären Alzheimer-Form (GEORGE-HYSLOP 2000).

Weitere potentielle Risikogene wurden auf den Chromosomen 6, 9, 10 und 12 identifiziert (KEHOE et al. 1999). Erst kürzlich wurden genetische Veränderungen in der Expression des neuronalen Sorting-Rezeptors SORL1 (Sortilin-related receptor L) mit der spät einsetzenden Form der Alzheimerschen Erkrankung (LOAD) assoziiert; herabgesetzte SORL1-Expression führt zu verstärktem APP-Prozessing durch β - und γ -Sekretasen und somit zur Bildung von β -Amyloid (ROGAEVA et al. 2007).

2.1.2 Pathogenese

2.1.2.1 APP-Prozessing

Das reife Vorläuferprotein APP wird auf zwei alternativen Wegen posttranslational prozessiert. Der größte Teil des membranständigen APP wird an der Plasmamembran durch die α -Sekretase innerhalb der β -Amyloid-Region hydrolytisch gespalten. Es kommt zur Sekretion der löslichen Ektodomäne ($sAPP_{\alpha}$) in das Vesikellumen oder in den Extrazellulärraum. Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment, das sogenannte C83-Peptid, ist nicht amyloidogen (ESCH et al. 1990; SISODIA et al. 1990; SISODIA 1992). Dieses kann durch die γ -Sekretase weiter in das nicht pathogene p3-Peptid gespalten werden.

Man kennt heute zahlreiche Proteine, die eine α -Sekretase-ähnliche Aktivität aufweisen; dabei handelt es sich um membrangebundene Disintegrine und Metalloproteasen (oder auch Adamalysine genannt) wie ADAM17 (auch „TACE“ wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) converting enzyme genannt), ADAM10 und ADAM9 (BLOBEL 1997; HOOPER & TURNER 2002; SLACK et al. 2001).

Durch forciertes α -Sekretase-Prozessing des APP wird ein signifikanter Rückgang der β -Amyloid-Formation erreicht (BUXBAUM et al. 1993; GABUZDA et al. 1993).

Alternativ zu dieser α -Sekretase-Aktivität kann APP jedoch auch durch β - und γ -Sekretasespaltung prozessiert werden. Dabei wird APP zunächst durch die β -Sekretase innerhalb der extrazellulären Domäne am N-terminalen Ende der β -Amyloid-Region gespalten. Es wird ähnlich der α -Sekretase-Prozessierung lösliches $sAPP_{\beta}$ sezerniert. Gleichzeitig entsteht allerdings auch ein membrangebundenes C-terminales Fragment, das C99-Peptid. Erst in einem nächsten Schritt werden durch die proteolytische Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes 38 bis 42 Aminosäuren lange Peptide gebildet (z.B. βA_{1-38} , βA_{1-40} , βA_{1-42}), die aggregieren und sich als β -Amyloid-Plaques ablagern (HAASS & SELKOE 2007).

Zwei Enzyme sind für die β -Sekretase-Prozessierung identifiziert worden, die sogenannten β -site APP-cleaving enzymes BACE1 und BACE2 (HUSE & DOMS 2000; NUNAN & SMALL 2000; DINGWALL 2001). APP-Prozessing durch β -Sekretase-Spaltung ist in den meisten Zellen des Organismus von untergeordneter Bedeutung. In Neuronen jedoch herrscht dieser Spaltungsweg vor (TIENARI et al. 1997).

2.1.2.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Vor über zehn Jahren wurde erstmalig die Ablagerung von β -Amyloid-Peptiden im Hirngewebe zu sogenannten Plaques als Ursache für die bei der Alzheimerschen Erkrankung auftretende

Neurodegeneration angesehen. Ein verändertes APP-Prozessing sowie die erhöhte Produktion von β -Amyloid spielen sowohl bei den vererbaren als auch bei den sporadischen AD-Formen eine zentrale Rolle.

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (siehe Abb. 2.1.2.2.a) wird von zahlreichen Arbeitsgruppen als Modell für die Entstehung der Alzheimerschen Krankheit herangezogen. Nach dieser Hypothese wird die relative Zunahme von βA_{42} im Gehirn als primäres Ereignis betrachtet. Diese βA_{42} -Erhöhung forciert die Formation und Akkumulation von Oligomeren, die wiederum veränderte synaptische Funktionen und inflammatorische Reaktionen induzieren. Die Inflammation geht mit einer Aktivierung von Mikroglia und Astroglia einher, in dessen Folge es zur Freisetzung von potentiell neurotoxischen Substanzen, wie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, proinflammatorischen Zytokinen, Komplementproteinen und weiteren inflammatorischen Mediatoren kommt, die die neurodegenerativen Prozesse vorantreiben (AKIYMA et al. 2000; MCGEER & MCGEER 2001; EIKELENBOOM et al. 2002; ROGERS et al. 2002; HAASS & SELKOE 2007). Somit initiiert die βA -Ablagerung die weitere Alzheimer-Pathogenese und pathogenetische Merkmale, wie die Formation der neurofibrillären Bündel (neurofibrillary tangles, NFT) einschließlich der Generation von Tau-Protein, sind Folgeschritte, die aus der Imbalance zwischen $A\beta$ -Produktion und dessen Clearance resultieren.

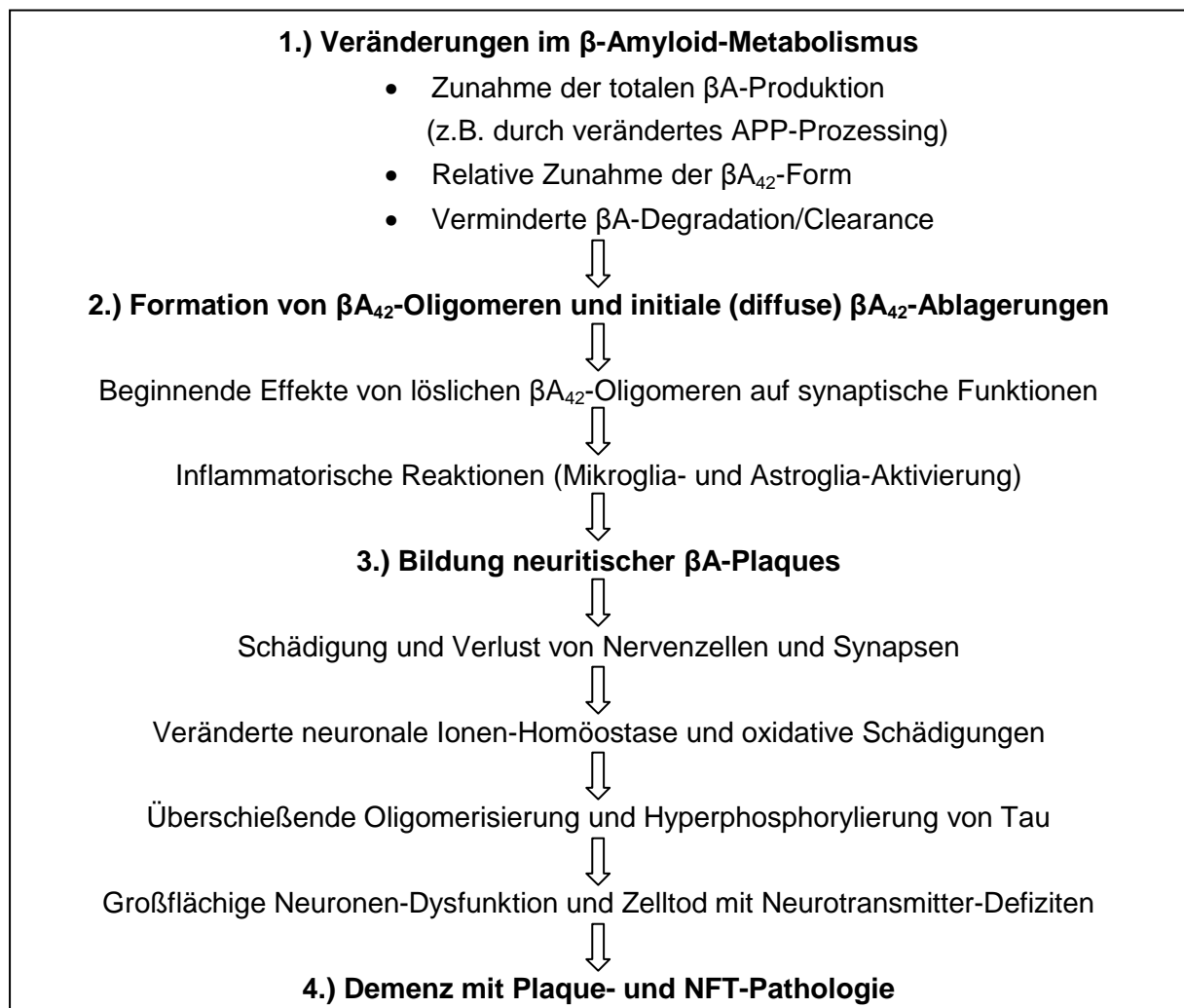


Abb. 2.1.2.2.a: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (modifiziert nach HAASS & SELKOE 2007)

Kritiker dieser Hypothese vertreten jedoch die Meinung, dass Veränderungen im Zellstoffwechsel, insbesondere die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins die eigentliche Ursache der Neurodegeneration darstellen. Das meist genannte Gegenargument zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass die Anzahl der Amyloid-Ablagerungen im Gehirn nur teilweise mit dem Ausmaß der Demenz der Patienten korreliert. Weiter wird argumentiert, dass Amyloid-Ablagerungen auch abseits der Bereiche des Neuronenverlusts nachgewiesen werden und dass in einigen älteren Menschen ohne jegliche AD-Symptome zahlreiche kortikale β A-Ablagerungen gefunden wurden.

Allerdings handelt es sich bei diesen Ablagerungen bei älteren gesunden Menschen fast ausschließlich um diffuse Plaques, die nicht mit arrondierter neuritischer oder glial bedingter Pathologie einhergehen. Des Weiteren korreliert der Ausprägungsgrad der Alzheimerschen Demenz eindeutig besser mit der Anzahl der Plaques, wenn diese statt histologisch mit biochemischen Assays detektiert werden (HAASS & SELKOE 2007); außerdem scheint die Konzentration von gelösten β A-Formen, welche immunhistochemisch nicht nachweisbar sind, dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung zu entsprechen (LUE et al. 1999; MCLEAN et al. 1999; WANG et al. 1999; NASLUND et al. 2000; HAASS & SELKOE 2007). Diese gelösten Oligomere sind nach neuesten Erkenntnissen die eigentlichen bioaktiven, toxischen Substanzen, die eine Dysfunktion von Synapsen und eine neuronale Dystrophie induzieren (HAASS & SELKOE 2007).

2.1.3 Mikroglia als residenter Makrophage des ZNS

Mikrogliazellen sind im Zentralnervensystem vorkommende Gliazellen mesodermalen Ursprungs, die in der Maus eine mittlere Lebensdauer von ca. 750 bis 1000 Tagen und damit eine der langsamsten Turn-Over-Raten aller residenten Makrophagen aufweisen (LAWSON et al. 1992). Zu den Funktionen der Mikroglia zählt neben Phagozytose und Antigen-Präsentation auch die Sicherung der neuronalen Vitalität. Aufgrund dieses breiten Funktionsspektrums wird die Rolle von Mikroglia im AD-Geschehen ausgesprochen divergierend diskutiert (siehe 2.1.3.1).

Der erste Nachweis von Mikrogliazellen gelang dem Neurophysiologen Pio DEL RIO-HORTEGA (1919) durch eine Silber-Karbonat-Färbetechnik. In den 80iger Jahren wurden enzymatische (OEHMICHEN 1980; OEHMICHEN et al. 1980) und histochemische Färbetechniken durch die Etablierung spezifischer Antikörper und Lektine zum Nachweis von Mikroglia entwickelt (PERRY et al. 1985; MANNOJI et al. 1986; STREIT & KREUTZBERG 1987). Derzeit stehen zahlreiche monoklonale Antikörper für den Mikroglia-Nachweis zur Verfügung, die gegen verschiedene Immunmoleküle, wie beispielsweise Major Histocompatibility Complex (MHC)-Antigene, Komplement-Rezeptoren oder Zelladhäsions-Moleküle, gerichtet sind.

Das morphologische Erscheinungsbild der Mikroglia spiegelt ihren funktionellen Zustand wider. Ruhende Mikrogliazellen stellen sich als lange, schlanke Zellen mit einer großen Oberfläche dar, deren lange, dünne, zytoplasmatische Fortsätze sich meist rechtwinklig zueinander verzweigen. Ruhende Mikrogliazellen weisen ein geringeres Spektrum an Oberflächenantigenen auf, beispielsweise werden MHC-II-Moleküle nur von aktivierten Zellen exprimiert (GRAEBER & STREIT 1990; GRAEBER et al. 1990; ROGERS & LUE 2001).

Durch verschiedenste Stimuli unter pathologischen Zuständen verändern Mikroglia ihre Morphologie und werden zu hypertrophen Zellen mit kurzen, gedrungenen, dicken Zellfortsätzen. In neurodegenerativen Prozessen transformieren sich Mikrogliazellen zu phagozytotisch aktiven, runden, amöboiden Zellen, die sich morphologisch nicht von aus dem Blutgefäßsystem eingewanderten Makrophagen unterscheiden (STREIT et al. 1988). Diese mikrogliale Plastizität lässt sich auch *in vitro* nachweisen, wenn diese Zellen aus dem ZNS isoliert werden (GIULIAN & BAKER 1986; WILLIAMS et al. 1992). Kultivierte Mikrogliazellen erscheinen Makrophagen-ähnlich, indem sie ihre Ramifizierung verlieren und typische Makrophagenantigene exprimieren (GRAEBER et al. 1989).

In den letzten 10 bis 15 Jahren bestätigten zahlreiche Untersuchungen sowohl im humanen als auch im Versuchstiersitus, dass diverse neuropathologische Zustände stets mit einer Mikrogliose einhergehen (BANATI & GRAEBER 1994). Mikrogliazellen sind in der Lage, auf kleinste Veränderungen der Neurovitalität zu reagieren. Diese Zellreaktion kann histochemisch – durch Veränderung der Zellmorphologie – dargestellt werden, lange bevor die eigentliche degenerative Veränderung nachweisbar ist.

Mikroglia stellen eine hoch reaktive Zellpopulation dar, die eine wichtige Rolle bei Abwehrprozessen durch Erkennung und Eliminierung von Pathogenen, Regulation der adaptiven Immunantwort und Beteiligung an homöostatischen, antiinflammatorischen Mechanismen spielt. Immunmodulatorische Effekte aktivierter Mikrogliazellen sind in verschiedensten pathologischen Zuständen, wie axonaler Schädigung, Ischämie, Tumoren, Traumata, infektiösen, autoimmunbedingten und neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben worden (BANATI & GRAEBER 1994; GEHRMANN et al. 1995; GEBICKE-HAERTER et al. 1996; KREUTZBERG 1996; STREIT et al. 1999; MINGHETTI & LEVI 1998; STOLL & JANDER 1999). Diverse Rezeptoren auf der Oberfläche aktivierter Mikrogliazellen (siehe Tab. 2.1.3.a) detektieren Signale von beschädigten oder apoptotischen Zellen, T-Zellen oder mikrobiellen Pathogenen, wie dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), und induzieren so die mikrogliale Aktivierung.

Tab. 2.1.3.a: Signalerkennung durch mikrogliale Rezeptoren bei Abwehrprozessen (aus ALOISI 2001)

Rezeptor	Liganden
Zytokin-Rezeptoren	Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , Transforming Growth Factor- β (TGF- β), IL (Interleukin)-1, IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra), IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18
Chemokin-Rezeptoren	CC, CXC, CX3C, C
Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs)	Pathogen-associated molecular patterns (PAMPS), wie LPS, Mannose, bakterielle/virale DNA/RNA
Komplement-Rezeptoren	Komplementproteine
Fc-Rezeptoren	Immunglobuline, Komplementproteine, Serumkomponenten
Apoptose-Rezeptoren	Fas-Liganden
Prostaglandin-Rezeptoren	PGE2, Prostaglandin J2 (PGJ2)
Weitere Rezeptoren	Membrangebundene Glykoproteine, wie OX2, CD ₄₀ -Ligand

Aktivierte Mikrogliazellen übernehmen zahlreiche Abwehraufgaben, wie Phagozytose, Entzündungsinduktion durch Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren (siehe Tab. 2.1.3.b) und Regulation von spezifischen T-Zellreaktionen durch Antigen-Präsentation und Steuerung der Th₁- und Th₂-Immunantwort (ALOISI 2001).

Tab. 2.1.3.b: Inflammatorische und immunregulatorische mikrogliale Mediatoren (aus ALOISI 2001)

<u>Proinflammatorische Zytokine</u>	→ IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF-α
<u>Antiinflammatorische Zytokine</u>	→ IL-10, IL-1Ra, TGF-β
<u>Chemokine</u>	→ IL-8, IFN-γ-inducible protein-10 (IP-10), macrophage inflammatory protein (MIP)-1β, MIP-3β, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), macrophage-derived chemokine (MDC)
<u>Zytotoxische Moleküle</u>	→ Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), Stickstoff- und Sauerstoffradikale
<u>Prostanoide</u>	→ Prostaglandine und Thromboxane

2.1.3.1 Aktivierte Mikroglia im AD-Geschehen – Schädlich oder förderlich?

Die Rolle von Mikroglia im AD-Geschehen wird ausgesprochen kontrovers diskutiert. β-Amyloid und andere Komponenten der Plaques sind in der Lage, die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-1β oder Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) durch Astro- und Mikroglia zu potenzieren (CHONG 1997; FORLONI et al. 1997). Insbesondere aktivierte Mikrogliazellen produzieren des Weiteren proinflammatorische Chemokine (AKIYAMA et al. 2000) sowie zytotoxische Faktoren, wie Superoxide (COLTON & GILBERT 1987), Stickstoffmonoxid (MOSS & BATES 2001; LIU et al. 2002), reaktive Sauerstoffspezies (MEDA et al. 1995) und Exzitotoxine (GIULIAN et al. 1995; ESPEY et al. 1997; GIULIAN 1997). Bei chronischer mikroglialer Aktivierung oder fehlender Gegenregulation führen diese Prozesse zu Neurodegeneration und Zelltod.

Neben der Mikroglia spielt das Komplementsystem bei den AD-assoziierten inflammatorischen Reaktionen eine wichtige Rolle. Amyloid-Ansammlungen und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (NFT) aktivieren das Komplementsystem über den klassischen Weg (MCGEER & MCGEER 1995), wobei kleine, anaphylaktoide Fragmente sowie der Membrane Attack Complex (MAC) generiert werden. Die Bildung des MAC führt zur Perforation der Zellmembran durch Transmembran-Kanäle, die eine freie, unkontrollierte Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen in und aus der Zelle ermöglichen, in dessen Folge es zur Störung der zellulären Homöostase, insbesondere der Kalzium-Homöostase, und zur Zelllyse kommt (AKIYAMA et al. 2000).

Die vermehrt freigesetzten proinflammatorischen Zytokine stimulieren wiederum die Sekretion zahlreicher Proteine, die in den Plaques zu finden sind (MCGEER & MCGEER 1997) und aktivieren im Konzert mit den in der Komplement-Kaskade entstandenen Anaphylatoxinen weitere Mikrogliazellen; es entsteht ein Circulus vitiosus (Abb. 2.1.3.1.a). Mikrogliazellen können jedoch auch direkt durch Bestandteile der Plaques, wie Chromogranin A (TAUPENOT

et al. 1996) oder β -Amyloid (MCGEER & MCGEER 1995; GIULIAN et al. 1996; KLEGERIS & MCGEER 1997; KLEGERIS et al. 1997) aktiviert werden.

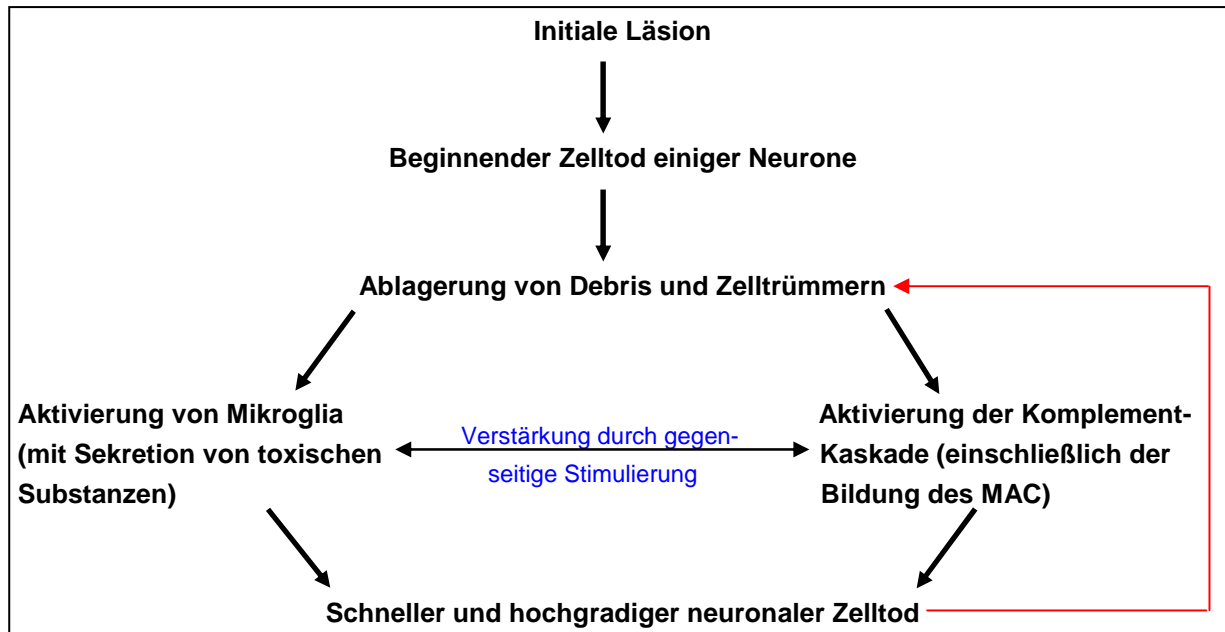


Abb. 2.1.3.1.a: Autotoxische Wechselwirkungen im Verlauf der AD (nach MCGEER & MCGEER 1998)

Zelluläre Motoren dieser AD-assoziierten, unspezifischen Entzündungskaskade sind vorrangig Mikroglia, aber auch Astrozyten, die zu den Amyloid-Ablagerungen migrieren, sich anlagern, proliferieren - was pathohistologisch in der Mikro- und Astroglie Ausdrück findet - und zahlreiche Entzündungsmediatoren entsenden. Auch Neuronen sind an dem Entzündungsgeschehen beteiligt, da auch sie in der Lage sind, Entzündungsmediatoren wie Komplement (FISCHER et al. 1995), Cyclooxygenase (COX) (HO et al. 1999) und die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α (BREDER et al. 1993; TCHELINGERIAN et al 1994; YAN et al 1995; BOTCHKINA et al. 1997; GONG et al. 1998; MURPHY et al. 1999; ORZYLOWSKA et al. 1999; SUZUKI et al. 1999) zu produzieren.

Als phagozytotisch aktive Zellen verfügen Mikroglia über ein sogenanntes „respiratory burst system“ (NADPH-Oxidase), das in der Lage ist, aus Sauerstoffmolekülen große Mengen von Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid, Singletsauerstoffmoleküle und Hydroxylradikale zu generieren. In Gehirnen von Alzheimer-Patienten wird die NADPH-Oxidase verstärkt aktiviert (SHIMOHAMA et al. 2000). Die toxischen Sauerstoffderivate werden durch Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutase so gesteuert, dass sie primär auf die Pathogene innerhalb der Phagolysosomen einwirken (FORMAN & TORRES 2001). Dieses System ist die Hauptstrategie, mit der Phagozyten eindringende Fremdpartikel und Tumorzellen abtöten. Allerdings besitzt dieser effiziente Mechanismus nicht die Fähigkeit, Fremd- und Eigenmaterial zu unterscheiden, sodass häufig eine Schädigung der Zellen sowie der direkten Umgebung und damit eine „bystander damage“ die Folge ist. Aktivierte Mikrogliazellen können außerdem Glutamat produzieren (KLEGERIS & MCGEER 1997; KLEGERIS et al. 1997); hohe extrazelluläre Level dieser exzitatorischen Aminosäure können eine neurotoxische Wirkung entfalten.

Während dieser inflammatorischen Prozesse werden gleichzeitig gegenregulierende Mechanismen aktiviert, um einen überschießenden, inflammatorischen Prozess durch permanente Mikroglia-Aktivierung zu vermeiden und Heilung sowie Regeneration zu ermöglichen. Dazu gehören die mikrogliale und astrogliale Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren, wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (VAN DER WAL et al. 1993; FLANDERS et al. 1995; PERESS et al. 1995; KIEFER et al. 1998; DE GROOT et al. 1999; APELT & SCHLIEBS 2001), IL-4 (ANDERSON & MOSSER 2002), IL-10 (JANDER et al. 1998; ALOISI et al. 1999; APELT & SCHLIEBS 2001; DE GROOT et al. 2001), IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) (LIU et al. 1998) und Prostaglandin E2 (PGE2) (ALOISI et al. 1999; DE GROOT et al. 2001) sowie Neurotrophenen, wie Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) (NEUMANN et al. 1998; WEI & JONAKAIT 1999). Durch die Produktion dieser antiinflammatorischen und neuroprotektiven Mediatoren wirken Mikrogliazellen dämpfend auf die Entzündungskaskade und wirken somit den entzündungsbedingten Konsequenzen, wie Zelltod, entgegen. Für eine protektive, Mikroglia-vermittelte Immunantwort ist das Funktionieren dieses fein balancierten Gleichgewichts zwischen Mikroglia aktivierenden und gegenregulierenden Mechanismen essentiell.

Aktivierte Mikroglia sind neben den unter 2.1.3.2 beschriebenen Clearance-Mechanismen, die β A-Degradation durch proteolytische Enzyme, Phagozytose und damit assoziierte Rezeptoren sowie β A-Abtransport über das Gefäßsystem beinhalten, an zahlreichen weiteren neuroprotektiven Mechanismen beteiligt:

Unter den bereits genannten antiinflammatorischen **Zytokinen** wirkt insbesondere TGF- β 1 protektiv, da es Mikroglia zur β A-Clearance stimuliert (WYSS-CORAY et al. 2001a). Des Weiteren verstärkt es die Expression von antiapoptotischen oder Kalzium-stabilisierenden Faktoren, wie Calbindin, und schützt so neuronale Zellen vor β A- und Glutamat-vermittelter Neurotoxizität (FLANDERS et al. 1998). **Chemokine** sind chemotaktische Zytokine, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und die Akkumulation von Leukozyten in Entzündungsherden steuern (LUSTER 1998; CHARO & RANSOHOFF 2006). Die Arbeitsgruppe um EL KHOURY (2007) zeigte kürzlich, dass der von Mikroglia exprimierte Chemokinrezeptor Ccr2 die früh einsetzende Mikroglia-Akkumulation noch vor Einsetzen der Plaque-Formation induziert; diese Ccr2-abhängige Mikroglia-Akkumulation stellt einen protektiven Mechanismus durch Förderung der β A-Clearance in frühen Stadien der Alzheimerschen Erkrankung dar, da Ccr2-Defizienz zu verminderter Mikroglia-Akkumulation und infolge dessen zu verstärkter β -Amyloid-Ablagerung führt.

Auch **Komplement-Komponenten** können vor β A-induzierter Neurotoxizität schützen, indem sie die β A-Akkumulation reduzieren und die Beseitigung von β -Amyloid und degenerierenden Neuronen fördern; WYSS-CORAY und Mitarbeiter (2002) blockierten die Aktivierung des Komplement-Komplexes C3 in APP-transgenen Mäusen und registrierten anschließend eine verminderte mikrogliale Aktivierung mit erhöhter Plaque-Formation und starker Neurodegeneration. Auch das C5a-Protein der Komplement-Kaskade schützt vor Exzitotoxinen wie Glutamat und aktiviert die neuroprotektive **Mitogen-aktivierte Proteinkinase** (MAPK) (OSAKA et al. 1999). Die Komplement-Komponente C1q verbessert die Opsonierung von β -Amyloid und erleichtert so dessen Phagozytose durch Mikroglia (WEBSTER et al. 2001).

Neben den bereits genannten **Neurotrophinen** wirken auch Norepinephrin und Neuropeptide, wie **α -Melanozyten-stimulierendes Hormon** (α -MSH), **Vasoaktives Intestinales Polypeptid** (VIP) und **Hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid** (HAZAP) neuroprotektiv, indem sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Stickstoffmonoxid durch aktivierte Mikrogliazellen unterdrücken (HETIER et al. 1991; DELGADO et al. 1998; KIM et al. 2000).

Trotz dieser Diskrepanzen bezüglich der positiven oder negativen Beeinflussung des Alzheimer-Geschehens durch diese Zellpopulation besteht große Einigkeit darüber, dass Mikrogliazellen eine entscheidende Rolle im Alzheimer-Geschehen innehaben.

Da Mikrogliazellen die einzigen Zellen des ZNS-Parenchyms sind, die in der Lage sind, MHC und kostimulierende Moleküle zu exprimieren (DE SIMONE et al. 1995), sind sie auch in autoimmunen und infektiösen Erkrankungen von essentieller Bedeutung. Die einzige immunkompetente und Antigen-präsentierende Zelle des ZNS – die Mikrogliazelle – stellt aufgrund dieser komplexen Interaktionen und Aktivitäten eine wichtige therapeutische Targetstruktur dar.

2.1.3.2 Mikroglia-vermittelte β -Amyloid-Clearance

Über den Metabolismus und den Abbau von β -Amyloid ist derzeit relativ wenig bekannt. Da β -Amyloid jedoch auch physiologischerweise permanent im Gehirn gebildet wird, müssen zwangsläufig effiziente Clearance-Mechanismen existieren, die eine Akkumulation sowie eine anschließende Ablagerung von β -Amyloid verhindern. Ein pathogenetischer Ansatz beruht auf der Dysfunktion dieser Clearance-Mechanismen: Sind Abbau-Systeme in ihrer Funktion beeinträchtigt bzw. altersbedingt zunehmend ineffizient, kommt es zur Amyloid-Akkumulation und -Ablagerung und die Kaskade der Plaque-Pathologie beginnt. Defizite oder Überlastung der Clearance-Mechanismen könnten die große Mehrheit der Alzheimer-Fälle - die sporadische Form - erklären, bei denen es zu einer exzessiven Akkumulation von β -Amyloid kommt, obwohl keine übermäßige β -Amyloid-Produktion vorliegt (QIU et al. 1998).

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass Mikrogliazellen nach Aktivierung durch verschiedenste Stimuli in der Lage sind, die β A-Clearance zu vermitteln (WISNIEWSKI et al. 1991; FRAUTSCHY et al. 1992; SHAFFER et al. 1995; ARD et al. 1996; EL KHOURY et al. 1996, 1998, 2007; PARESCE et al. 1996, 1997; QIU et al. 1997, 1998; DEWITT et al. 1998; WELDON et al. 1998; CHUNG et al. 1999; SCHENK et al. 1999; BARD et al. 2000; NAKAGAWA et al. 2000; WEBSTER et al. 2000; BACSKAI et al. 2001; DICARLO et al. 2001; LIM et al. 2001; VON BERNHARDI & RAMIREZ 2001; WILCOCK et al. 2001, 2003, 2004a, b, c; WYSS-CORAY et al. 2001a, 2002; YOUNKIN 2001; JANTZEN et al. 2002; ROGERS et al. 2002; KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004; MORGAN 2006; NICOLL et al. 2006). Die Beseitigung von β -Amyloid aus dem Gehirn kann durch folgende, wahrscheinlich synergistisch wirkende Mechanismen erzielt werden:

- a) Phagozytose durch Mikroglia mit anschließender endosomal-lysosomaler Proteolyse.
- b) Proteolytische Degradation durch extrazelluläre Proteasen, die insbesondere von Mikroglia, aber auch von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten freigesetzt werden, anschließend möglicherweise a) oder c).

- c) β A-Abtransport über das Gefäßsystem, möglicherweise nach a) oder b) als freies Peptid oder gebunden an Antikörper oder Mikroglia.

a) β A-Phagozytose

Mikroglia exprimieren zahlreiche Rezeptoren (Tab. 2.1.3.a und Tab. 2.1.3.2.a), die Phagozytose vermitteln und somit eine wichtige Funktion im Clearance-Geschehen einnehmen, wie Fc-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren (BARD et al. 2000, 2003; ROGERS et al. 2002), Scavenger-Rezeptoren (PARESCE et al. 1996; EL KHOURY et al. 1996, 1998), Receptor for advanced glycation end products (RAGE) (YAN & CHEN 1996; WYSS-CORAY et al. 2001b), Integrine (BAMBERGER et al. 2003; KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004) und Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs), wie Toll-like receptors (TLRs) (KAISHO & AKIRA 2000; BSIBSI et al. 2002; OLSON & MILLER 2004). Bis auf RAGE, der die Phagozytose sowohl von löslichem als auch fibrillärem β -Amyloid vermittelt, induzieren alle genannten Rezeptoren die Phagozytose von fibrillärem β -Amyloid (Tab. 2.1.3.2.a). Derzeit besteht jedoch noch keine Einigkeit über das weitere Schicksal der internalisierten β -Amyloid-Peptide. Durch elektronenmikroskopische Analysen an kultivierten Ratten-Mikrogliazellen konnte β -Amyloid intrazellulär in Phagosomen-ähnlichen Vesikeln nachgewiesen werden (ARD et al. 1996); diese Mikrogliazellen waren in der Lage, β -Amyloid effektiv vom Kulturmedium zu entfernen und es anschließend intrazellulär anzusammeln. PARESCE und Mitarbeiter (1997) beschrieben, dass Mikrogliazellen sehr schnell große β -Amyloid-Mengen intrazellulär aufnehmen, jedoch nur eine geringe Menge langsam abbauen. Laut PARESCE wird nach der Aufnahme kein β -Amyloid-Material nach extrazellulär ausgeschleust, sodass die Zellen langsam damit „gemästet“ werden. Im Gegensatz dazu stehen die *in vitro*-Untersuchungen von CHUNG et al. (1999); demnach phagozytieren Mikrogliazellen zwar β -Amyloid, jedoch wird nur ein kleiner Teil intrazellulär abgebaut - der größte Teil wird unverändert wieder ausgeschleust.

VON BERNHARDI & RAMIREZ (2001) zeigten, dass *in vitro*-Mikroglia über eine enorme Phagozytose-Kapazität sowohl von β -Amyloid als auch von APP verfügt. Auch diese Arbeitsgruppe beschreibt, dass der Abbau von exogenem APP und β -Amyloid ausschließlich intrazellulär via Endosomen und Lysosomen vollzogen wird, extrazelluläre Proteasen konnten nicht nachgewiesen werden. Phagozytotisch aktiv waren lediglich Mikrogliazellen, Astrozyten zeigten keine Phagozytose. In einer *in vitro*-Studie konnte auf ultrastruktureller Ebene gezeigt werden, dass kultivierte Mikrogliazellen effektiv β -Amyloid phagozytieren und in sekundären Lysosomen internalisieren (D'ANDREA et al. 2004).

Es gibt auf Makrophagen zwei klassische Phagozytose-Rezeptoren: IgG-Rezeptoren (Fc γ R1 und Fc γ R3) induzieren die sogenannte **Typ-I-Phagozytose** (KAPLAN 1977; CARON & HALL 1998), bei der die Zelle durch Extension ihrer Pseudopodien die zu phagozytierende Zielsubstanz umschließt. Komplement-Rezeptoren (CR3 = Mac-1 = α β 2 = CD_{11b}/CD₁₈) hingegen induzieren die **Typ-II-Phagozytose**, die auch „passive“ Phagozytose genannt wird, da Komplement-opsonierte Partikel direkt in das Zytoplasma einfließen ohne Bildung von Membranextensionen (KAPLAN 1977). Für die mikrogliale Phagozytose von fibrillärem β -Amyloid-Material ist zusätzlich ein von diesen klassischen Mechanismen abweichender

Zelloberflächen-Rezeptor-Komplex identifiziert worden (BAMBERGER et al. 2003). Die funktionellen Komponenten dieses Komplexes beinhalten das Integrin-assoziierte Protein/CD₄₇, das $\alpha_6\beta_1$ -Integrin sowie den B-Scavenger-Rezeptor CD₃₆, die die mikrogliale Phagozytose von fibrillärem β -Amyloid induzieren (KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004). Die Bindung von fibrillärem β -Amyloid an diesen Rezeptor-Komplex führt über die Aktivierung von Tyrosin-Kinase-abhängigen Signalkaskaden zur Mikroglia-Aktivierung (MCDONALD et al. 1997; COMBS et al. 1999), die wiederum durch Zytokinproduktion eine Rekrutierung und Steuerung weiterer Mikrogliazellen zu β -Amyloid-Ablagerungen induziert (ROGERS & LUE 2001).

Auch der in aktiven und passiven Vakzinierungsstudien erzielten β A-Clearance liegt wahrscheinlich die mikrogliale Phagozytose als wichtigster Mechanismus zugrunde (SCHENK et al. 1999; BARD et al. 2000; SELKOE & SCHENK 2003).

b) β A-Proteolyse

In den letzten Jahren stand der extrazelluläre Abbau von β -Amyloid durch extrazelluläre Proteasen im Mittelpunkt der Studien zur β A-Clearance, die insbesondere von Mikroglia, aber auch von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten freigesetzt werden. So wurde durch *in vivo*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe um IWATA (2000) die Metalloendopeptidase **Neprilysin** (NEP; Enkephalinase) als wichtigste β -Amyloid₁₋₄₂-abbauende Protease des Rattengehirns beschrieben. Eine induzierte Erhöhung der neuronalen Neprilysin-Level führte zu einer signifikanten Reduktion von β -Amyloid im Gehirn sowie zu einer fast vollständigen Unterbindung der Plaque-Bildung (MOHAJERI et al. 2002). Andererseits kann eine partielle Herabregulation von Neprilysin zu steigendem β -Amyloid₁₋₄₂-Gehalt mit anschließender Akkumulation und Plaque-Bildung einhergehen (IWATA et al. 2002).

Eine weitere β -Amyloid-abbauende Protease ist das Insulin-Degrading-Enzyme (**IDE**) (KUROCHKIN & GOTO 1994). Es handelt sich um eine Thiol-Metalloprotease, die sowohl in löslicher Form im Zytoplasma als auch membrangebunden in Neuronen und Mikroglia vorkommt (VEKRELLIS et al. 2000), und die insbesondere kleine Peptide wie Insulin, Glukagon und **atriales natriuretisches Peptid** (ANP) aufspaltet. In *in vitro*-Arbeiten von QIU et al. (1998) konnte nachgewiesen werden, dass IDE von kultivierten Mäuse-Mikrogliazellen sezerniert wird. Diese mikrogliale Metalloprotease ist in der Lage, sowohl endogene als auch synthetisch hergestellte β -Amyloid-Monomere abzubauen, lösliche β A-Dimere oder –Trimere werden jedoch nicht von ihr katabolisiert (QIU et al. 1998). Die Freisetzung von IDE durch Mikroglia *in vitro* wird durch Aktivierung der Mikroglia – beispielsweise durch Lipopolysaccharide – erhöht. Demzufolge wird der Umfang des β -Amyloid-Abbaus möglicherweise durch den Aktivierungszustand der Mikroglia durch verschiedene physiologische und pathologische Stimuli reguliert (QIU et al. 1997).

Eine *in vitro*-Studie der Arbeitsgruppe um MENTLEIN (1998) zeigte, dass Mikrogliazellen nach ihrer Aktivierung eine Metalloprotease freisetzen, die lösliches β -Amyloid degradieren kann, solange es noch nicht zu kompakten Ablagerungen aggregiert ist. Die Freisetzung dieser β -Amyloid-katabolisierenden Protease stellt eine zumindest in Zellkultur beobachtete protektive Funktion aktivierter Mikrogliazellen im Alzheimer-Geschehen dar.

In biochemischen *in vitro*-Studien wurden weitere Proteasen beschrieben, die zum proteolytischen Abbau von β -Amyloid befähigt sind (BACKSTROM et al. 1996; MCDERMOTT & GIBSON 1996; ECKMAN et al. 2001; SELKOE 2001b); von allen bisher untersuchten Proteasen sind jedoch nur **Plasmin** und **Kathepsin B** in der Lage, β A-Oligomere und höhere Aggregate zu degradieren (TUCKER et al. 2000; MUELLER-STEINER et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass sich die verschiedenen, an der Clearance beteiligten Zellen jeweils verschiedener Mechanismen bedienen, sodass Mikrogliazellen beispielsweise IDE als Haupt-Abbau-Protease nutzen, während Neuronen die Lyse von β -Amyloid vorrangig mittels der Metalloprotease EC 3.4.24.15 durchführen (YAMIN et al. 1999). Im Gegensatz zu Mikroglia und Neuronen konnte für Astrozyten beispielsweise keinerlei IDE-Freisetzung nachgewiesen werden (VEKRELLIS et al. 2000).

c) β A-Abtransport

Der Abtransport von β -Amyloid über das Gefäßsystem tritt in Kombination oder in Folge der bereits genannten Mechanismen auf; größeres oder abgelagertes β A-Material wird folglich erst durch Phagozytose oder/und Proteolyse degradiert. Kleinere, lösliche Moleküle können die Blut-Hirn-Schranke, die bei Alzheimer-Patienten intakt ist (ROZEMULLER et al. 1988), daher leichter passieren. Die Blut-Hirn-Schranke verfügt jedoch auch über spezialisierte β A-Transporter (ZLOKOVIC 2004). Die Arbeitsgruppe um FRAUTSCHY (1992) konnte nachweisen, dass β -Amyloid-beladene Mikrogliazellen zu Blutgefäßen und Ventrikeln migrieren, um β A zum Abtransport zu exozytieren oder um in toto abtransportiert zu werden. Sie fanden mittels ultrastruktureller Analysen β -Amyloid-enthaltende Mikrogliazellen im Lumen der Gefäße. β -Amyloid-Clearance über die Blut-Hirn-Schranke wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (siehe auch Diskussion 5.2.2) (SHIBATA et al. 2000; WYSS-CORAY et al. 2001a; WILCOCK et al. 2004a, b; ZLOKOVIC 2004). Die Bindung von β -Amyloid in der Peripherie zum Beispiel durch β A-spezifische Antikörper (DEMATTOS et al. 2001; SIGURDSSON et al. 2001) oder RAGE (DEANE et al. 2003) führt durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen peripherem und zentralnervösem β A-Gehalt zu einem β A-Efflux aus dem Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke (DEMATTOS et al. 2001, 2002; LEMERE et al. 2003).

Tab. 2.1.3.2.a: Zusammenfassende Übersicht primär Mikroglia-vermittelter β A-Clearance-Mechanismen

Effektor	β A-Form	Mechanismus	Referenz
Scavenger-Rezeptor	fibrillär	Phagozytose	EL KHOURY et al. 1996, 1998; PARESCIE et al. 1996
Fc- und Komplement-rezeptoren	fibrillär, häufig opsoniert		BARD et al. 1999; ROGERS et al. 2002
RAGE	fibrillär und löslich	Phagozytose; β A-Influx ins ZNS	YAN & CHEN 1996; WYSS-CORAY et al. 2001a; DEANE et al. 2003
Integrin-Rezeptoren	fibrillär	Phagozytose	BAMBERGER et al. 2003; KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004
Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)	löslich	β A-Efflux aus ZNS	SHIBATA et al. 2000
m266 (monoklonaler β A-Antikörper)			DEMATTO et al. 2001
IDE (Metalloprotease)	lösliche β A _{40/42} -Monomere	Proteolytische Degradation	KUROCHKIN & GOTO 1994; QIU et al. 1997, 1998
Plasmin (Serinprotease)	lösliche und fibrilläre β A-Oligomere und höhere Aggregate		TUCKER et al. 2000
Kathepsin B (Zystinprotease)			MUELLER-STEINER et al. 2006
Neprilysin (Metalloprotease)	fibrilläres β A ₄₂		IWATA et al. 2000, 2002; MOHAJERI et al. 2002

2.1.3.3 Die Mikroglia-Dysfunktions-Theorie

Nach der von STREIT (2004) etablierten Mikroglia-Dysfunktions-Hypothese haben Mikrogliazellen unter physiologischen Bedingungen eine neuroprotektive Funktion, deren Hauptaufgabe in der Gewährleistung der neuronalen Vitalität und Funktionalität liegt (STREIT 2002a, b). Ein wichtiger Aspekt dieser mikroglialen Schutzfunktion ist demnach die Clearance von anfallendem β -Amyloid durch Phagozytose bzw. durch Sekretion von Amyloid-degradierenden Enzymen, sodass die vitale Mikrogliazelle die Balance zwischen β -Amyloid-Produktion und –Abbau aufrecht erhält.

In humanen Gehirnen wurden dystrophische Mikrogliazellen mit abnormal strukturierten, teilweise fragmentierten zytoplasmatischen Fortsätzen gefunden, deren Anteil mit steigendem Alter stetig zunahm und die teilweise morphologische Kriterien von aktivierten Mikrogliazellen aufwiesen (STREIT et al. 2004). Infolge von zellulären Alterungsprozessen – eventuell forciert durch genetische oder epigenetische Faktoren - kommt es zur verminderten mikroglialen Clearance von β -Amyloid sowie zu einer Abnahme der trophischen Versorgung von Neuronen. Diese chronische neuronale Unterversorgung aufgrund von dysfunktionalen Mikrogliazellen

geht mit einer vermehrten neuronalen Produktion von β -Amyloid einher, was zusammen mit der verminderten mikroglialen Clearance die senile β -Amyloid-Plaquesformation hervorruft. Des Weiteren kommt es als Konsequenz der chronischen neuronalen Dysfunktion zu neurodegenerativen Prozessen, wie beispielsweise Synapsen-Verlust und Formation von neurofibrillären Bündeln. Diese neurodegenerativen Veränderungen – verstärkt durch erhöhte Freisetzung von neurotoxischen Substanzen, die beim Absterben der gealterten, dystrophisch gewordenen Mikrogliazellen erfolgt - sollen nach dieser Theorie letztendlich die pathogenetischen Mechanismen darstellen, die für die Auslösung der Demenz verantwortlich sind.

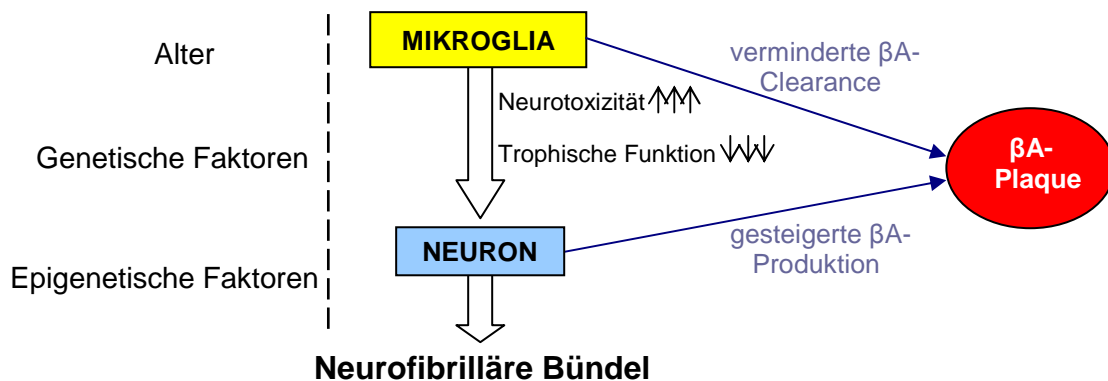


Abb. 2.1.3.3.a: Mikroglia-Dysfunktions-Theorie (modifiziert nach STREIT 2004)

2.1.4 Spezifische immunologische Prozesse

Die Alzheimersche Krankheit stellt keine typische immunpathologische Erkrankung dar; in Gehirnen von AD-Patienten wurden keine oder nur geringgradige lymphozytäre Infiltrationen gefunden (MCGEER & MCGEER 1998; AKIYAMA et al. 2000; COOPER et al. 2000). Eine frühere Studie belegte, dass β -Amyloid nicht in der Lage ist, lymphozytäre Proliferationen in AD-Patienten zu induzieren und konstatierte eine T-Zell-Anergie gegenüber β -Amyloid (TRIEB et al. 1996). Allerdings zeigten neuere Untersuchungen, dass β -Amyloid tatsächlich spezifisch-reaktive T-Zellen aktiviert und zwar sowohl in älteren, nicht dementen Personen als auch in AD-Patienten (MONSONEGO et al. 2003). β A-Peptide werden wahrscheinlich zunächst von Antigen-präsentierenden Zellen endozytiert, dann prozessiert und schließlich – gebunden an MHC-Moleküle – den T-Lymphozyten in der Peripherie präsentiert, die dadurch aktiviert werden (BLASKO & GRUBECK-LOEBENSTEIN 2003; MONSONEGO et al. 2003). MONSONEGO und Mitarbeiter (2003) registrierten eine HLA-DR Klasse II-Restriktion der β A-Antigen-Präsentation. Eine solche Antigen-Präsentation gegen-über IL-4- und IL-5-produzierenden CD₄-T-Helfer-Zellen vom Th₂-Typ würde zu einer Stimulation von B-Zellen mit anschließender Produktion von β A-spezifischen Antikörpern führen; β A-reaktive B-Zellen wurden in AD-Patienten nachgewiesen (GASKIN et al. 1993). β A-spezifische Antikörper wurden im Plasma von gesunden älteren Menschen und in AD-Patienten gefunden (DU et al. 2001; HYMAN et al. 2001). AD-Patienten wiesen signifikant niedrigere β A-Antikörper-Level im Liquor cerebrospinalis auf als gesunde Menschen (DU et al. 2001). BLASKO & GRUBECK-LOEBENSTEIN (2003) schlussfolgerten, dass eine herabgesetzte β A-spezifische Immun-

antwort durch verminderte T-Zellaktivität zu einer Reduktion der β A-Clearance führt, was wiederum erhöhte β A-Konzentrationen mit Bildung von β A-Aggregaten zur Folge hat.

Die therapeutischen Möglichkeiten durch Aktivierung spezifischer immunologischer Mechanismen wurden besonders durch eine Reihe von Vakzinierungsstudien unterstrichen (siehe 2.1.5), in denen aktive oder passive β A-Immunisierungen zu gesteigerter Clearance der β A-Ablagerungen führen.

Adaptive immunologische Prozesse wirken sich primär förderlich auf den Verlauf der Alzheimerschen Krankheit aus, indem sie protektive, aktivierte Mikrogliazellen dirigieren (BUTOVSKY et al. 2005, 2006; MORGAN et al. 2005) und die Clearance von β -Amyloid erleichtern (MONSONEGO et al. 2006). Störungen in der spezifischen Immunantwort führen jedoch zu verstärkter β A-Ablagerung und damit einhergehender Neurotoxizität. Dieser Tatsache müssen spezifische Vakzinierungsprotokolle gerecht werden, um Nebenwirkungen durch unkontrollierte inflammatorische Reaktionen zu vermeiden.

2.1.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Bedeutsamer Bestandteil der heutigen Pharmakotherapie der Alzheimerschen Demenz ist die Behandlung mit Antidepressiva und Cholinesterase-Inhibitoren, deren symptomatische Wirksamkeit und Verträglichkeit mittlerweile gut belegt sind (HAMPEL et al. 2003). Allerdings beeinflussen diese rein symptomatischen Therapieansätze in keiner Weise die zugrunde liegende pathophysiologische Progression der Erkrankung, sodass in den vergangenen Jahren intensiv an der Entwicklung neuer kausaler Strategien mit dem Ziel der Verlangsamung oder Verhinderung der fortschreitenden Neurodegeneration gearbeitet wurde.

1.) Modulation von Neurotransmittern

Zu den derzeit zur Behandlung der AD zugelassenen Substanzen zählen die *Cholinesterase-Inhibitoren*; durch die Hemmung dieses Enzyms, das den Neurotransmitter Acetylcholin abbaut, kann vorübergehend das durch die Neurodegeneration verursachte cholinerge Defizit ausgeglichen werden. Neben der initialen Besserung und langfristigen Stabilisierung kognitiver Symptome sind auch positive Wirkungen im Hinblick auf Verhaltensstörungen und Aktivitäten im täglichen Leben beobachtet worden (HAMPEL et al. 2003). Derzeit liegen für *Tacrin*, *Donepezil*, *Rivastigmin* und *Galantamin* umfangreiche klinische Studien vor, wobei *Tacrin* aufgrund grösserer Nebenwirkungen in den Hintergrund getreten ist. Die übrigen Mittel werden als Mittel der ersten Wahl in der Psychopharmakotherapie der AD empfohlen (ADLER et al. 1999).

Seit Mai 2002 ist EU-weit der potentiell neuroprotektive Glutamatmodulator *Memantine* zugelassen, der am **N-Methyl-D-Aspartat** (NMDA)-Rezeptor als nichtkompetitiver Glutamat-Antagonist wirkt. Glutamat wird in Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten überproduziert und wirkt exzitotoxisch auf Neuronen. Der NMDA-Kanal wird durch Memantine partiell blockiert, sodass er beispielsweise für glutamatvermittelte Lern- und Gedächtnisvorgänge voll verfügbar ist, aber gegen die exzitotoxischen Wirkungen von pathologisch erhöhten Glutamatkonzentrationen geschützt wird (HAMPEL et al. 2003; VOLBRACHT et al. 2006).

Zurzeit befinden sich auch Modulatoren weiterer Glutamaterezeptor-Subtypen, wie die **Adenosinmonophosphat-aktivierten** Proteinkinase (AMPA)-Rezeptoren in vorklinischen Studien; für die sogenannten *Ampakine* konnten symptomatische Wirkungen auf die neurokognitive Leistung sowie Auswirkungen auf den Neurotrophinstoffwechsel gezeigt werden (LYNCH 1998; HAMPEL et al. 2003).

2.) Amyloidreduzierende Strategien

2a.) Stoppen der β -Amyloid-Produktion

Durch partielle Hemmung der β - und γ -Sekretasen, die β -Amyloid aus APP generieren, kann die Amyloid-Bildung reduziert werden (ROJAS-FERNANDEZ et al. 2002; SELKOE & SCHENK 2003). Es werden unterschiedliche Hemmstoffe der beiden Sekretasen entwickelt, die in Tiermodellen und *in vitro* bereits eine gute Wirksamkeit in der Enzymhemmung zeigten (CITRON 2002). Insbesondere *BACE1* als β -Sekretase scheint eine ideale Zielsubstanz für die Anti-Amyloid-Therapie zu sein, allerdings müssen kleine, Blut-Hirn-Schranken-gängige, stabile Polypeptide entwickelt werden (CITRON 2002; EVIN & WEIDEMANN 2002). Auch die γ -Sekretase stellt eine potentielle therapeutische Zielsubstanz dar; es wurden potente Inhibitoren dieser Sekretase entwickelt, die effektiv die Bildung sowohl von βA_{40} als auch von βA_{42} verhindern können (ESLER et al. 2000; SEIFFERT et al. 2000; SHEARMAN et al. 2000; DOVEY et al. 2001). Allerdings sind dem therapeutischen Einsatz von γ -Sekretase-Hemmern durch Hemmung der für zelluläre Determinierung wichtigen Notch-Signaltransduktion Grenzen gesetzt (MUMM & KOPAN 2000; DOERFLER et al. 2001; GELLING et al. 2002). PETIT et al. (2001) haben jedoch Komponenten beschrieben, die in der Lage sind, die β -Amyloid-Formation ohne Beeinträchtigung der Notch-Signaltransduktion via γ -Sekretase-Hemmung zu verhindern. Auch die Arbeitsgruppe um WEGGEN (2001) beschreibt nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), die die γ -Sekretase-Aktivität zwar modulieren, aber nicht per se unterdrücken, indem sie die Schnittstelle der γ -Sekretase verschieben. Dadurch werden eine Abnahme der schnell aggregierenden βA_{42} -Fraktionen und eine verstärkte Produktion der kleinen, nicht aggregierenden βA_{38} -Fraktionen erreicht.

Eine weitere Option, die Amyloid-Akkumulation zu reduzieren wird durch die sogenannten „Plaque Buster“ versucht; es handelt sich um verschiedene chemische Agenzien wie z.B. *Kongo-Rot* (LORENZO & YANKNER 1994), das Antibiotikum *Rifampicin* (TOMIYAMA et al. 1996), *Doxorubicin*, *Nikotin* und *Benzofuran* (SOTO 1999). Diese verhindern zwar die β -Amyloid-Oligomerisierung und die Bildung von toxischen β -Amyloid-Protofibrillen, jedoch kommt keine dieser Substanzen als Therapeutikum beim Menschen in Betracht, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und zyto- (*Doxorubicin*), neuro- (*Nikotin*), hepatotoxisch (*Rifampicin*, *Benzofuran*) oder kanzerogen (*Kongo-Rot*, *Benzofuran*) wirken können. Viel versprechende Kandidaten sind kleine synthetische Peptide, die sogenannten „Beta-Sheet-Breaker“, die sich an das β -Amyloid anlagern und somit erfolgreich eine Zusammenlagerung zur Beta-Faltblattstruktur verhindern (SOTO 1999).

2b.) Erhöhung der β -Amyloid-Clearance

Eine Strategie zur Beseitigung bereits vorhandenen Amyloids besteht in der verstärkten Clearance. Insbesondere wurde auf dem Gebiet der aktiven (mittels synthetischem βA_{42} oder dessen Fragmenten) und passiven (mittels spezifischer, monoklonaler βA -Antikörper) Immunisierung experimentiert. Passive oder aktive Immunisierung führte zu einer Abnahme von βA -Ablagerungen in transgenen Mäusen, die mit einer Reduktion der kognitiven Defizite einhergeht (SCHENK et al. 1999; BARD et al. 2000, 2003; JANUS et al. 2000; MORGAN et al. 2000; BACSKAI et al. 2001, 2002; DAS et al. 2001; DEMATTOS et al. 2001; DODART et al. 2002; KOTILINEK et al. 2002; ZHOU et al. 2005; LEVITES et al. 2006).

Die aktive Immunisierung mit β -Amyloid führte zu einer Reduktion der Plaques verbunden mit deutlich verminderten Lern- und Gedächtnisdefiziten der transgenen Mäuse. Auch SIGURDSSON et al. (2001) führten erfolgreich aktive Immunisierungen transgener Mäuse durch, allerdings mit einem nicht amyloidogenen, βA -homologen Peptid, das nicht toxisch und schrankengängig ist, und erzielten eine Reduktion der hippokampalen und kortikalen Plaque-Belastung um 89 %. Erste aktive Immunisierungsversuche am Menschen im Rahmen einer Impfstudie mussten wegen des Auftretens von schweren Meningoenzephalitiden mehrerer Patienten abgebrochen werden (IMBIMBO 2002).

Im Rahmen von passiven Immunisierungen passieren peripher applizierte Antikörper gegen das β -Amyloid-Peptid in begrenztem Umfang die Blut-Hirn-Schranke und gelangen ins ZNS. Die gegen βA_4 gerichteten Antikörper stimulieren wahrscheinlich als Opsonin über Fc-Rezeptoren die mikrogliale Phagozytose von βA_4 oder führen zu einer β -Amyloid-Opsonierung durch Antikörper-gekoppelte Komplementaktivierung (BARD et al. 2000, 2003). Neben der Clearance von β -Amyloid könnten applizierte β -Amyloid-Antikörper des Weiteren zu einer Veränderung des inflammatorischen Umfelds führen, indem sie durch Aktivierung phagozytotisch aktiver Gliazellen eine Fc-Rezeptor-vermittelte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 stimulieren und gleichzeitig die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-12, hemmen (ANDERSON & MOSSER 2002; BARD et al. 2003).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass intravenöse Applikation polyklonaler menschlicher Immunglobuline zu einer Abnahme von β -Amyloid im Liquor (DODEL et al. 2002) und im Gehirnparenchym sowie zu einer entsprechenden Zunahme im Plasma führt; vermutlich führt die Bindung des peripheren β -Amyloids durch die applizierten Antikörper zu einer Verschiebung des βA -Gleichgewichts zwischen Peripherie und ZNS, was einen vermehrten βA -Efflux aus dem Gehirn zur Folge hat (DEMATTOS et al. 2001, 2002). Diese intravenöse β -Amyloid-Immunglobulinapplikation befindet sich zurzeit in den USA in der klinischen Testung (U.S. National Institutes of Health; National Institute on Aging 2006).

Ein großer Vorteil der **passiven** Immunisierung liegt in der guten Dosis-Kontrolle zirkulierender Antikörper. Insbesondere das Immunsystem älterer Patienten ist oft nicht in der Lage, eine effektive Antikörper-Reaktion gegen applizierte Aktiv-Vakzinen auszubilden. Andererseits sind auch überschießende Reaktionen des Immunsystems besser zu kontrollieren, da der Antikörpertiter bei der passiven Immunisierung durch Verminderung von Dosis und/oder Applikationsfrequenz reguliert werden kann (MORGAN & GITTER 2004).

Die beschriebenen erfolgversprechenden Vakzinierungsstrategien stellen „inflammatorische“ Therapiestrategien dar, die der Inflammation im Alzheimer-Geschehen eine nicht ausschließlich negative, sondern vielmehr eine therapeutisch nutzbare, förderliche Rolle zusprechen.

3.) Antiinflammatorische Strategien

Dieser Ansatzpunkt basiert auf der Erkenntnis, dass durch die progressive β -Amyloid-Akkumulation eine zelluläre inflammatorische Reaktion im zerebralen Kortex forciert wird (ROGERS et al. 1996); diese Neuroinflammation stellt ein charakteristisches Merkmal der AD-Pathologie dar. Es konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass die Häufigkeit der AD bei Personen, die langfristig nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) eingenommen hatten, deutlich reduziert ist. Daher lässt sich hypothetisch feststellen, dass NSAIDs das Einsetzen der Alzheimerschen Erkrankung durch Unterbrechung der inflammatorischen Mikroglia-, Astroglia- und Zytokin-Kaskade verzögern bzw. sogar verhindern (MOORE & O'BANION 2002). Andererseits wurde durch die Arbeitsgruppe um WEGGEN (2001) gezeigt, dass antiinflammatorische Pharmaka einen direkten Effekt auf die Spaltung von APP durch die γ -Sekretase haben. Das häufig angewendete, Blut-Hirn-Schranken-gängige NSAID *Ibuprofen* bewirkte *in vitro* eine Verringerung der Zytokin-getriggerten β -Amyloid-Produktion (BLASKO et al. 2001) und im AD-Mausmodell eine Verminderung der neuritischen Plaque-Pathologie und der Inflamationsprozesse (LIM et al. 2000). In einer über sechs Monate laufenden Studie mit *Indomethacin* war zwar ein positiver Trend auf die kognitive Leistung zu verzeichnen, jedoch lag eine hohe Abbruchrate aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen vor (ROGERS et al. 1993).

Eine relativ junge Substanzklasse stellen die *Coxibe* dar. Dabei handelt es sich um selektive COX-2-Hemmer, die keine Wirkung auf die COX-1 haben und somit kaum unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. Das derzeit im Hinblick auf eine β -Amyloid-Reduktion effektivste NSAID stellt das Flurbiprofen-Derivat *NCX-2216* dar, das allerdings erst in einem transgenen Mausmodell getestet wurde (JANTZEN et al. 2002) und dort im Zusammenspiel mit einer hochgradigen Mikroglia-Aktivierung eine massive Abnahme von löslichen und kompakten β -Amyloid-Ablagerungen in den Mäusegehirnen bewirkte. Allerdings zeigte eine andere Studie, dass COX-2-Hemmer *in vitro* eine gesteigerte Produktion toxischer βA_{1-42} -Peptide induzierten (KUKAR et al. 2005). Entgegen früheren Beobachtungen zeigten die NSAIDs *Naproxen* und *Celecoxib* auch in einer aktuellen Studie aus den USA, in der Patienten mit beginnenden kognitiven Dysfunktionen über vier Jahre mit einer der beiden Substanzen behandelt wurden, keine Wirksamkeit im AD-Geschehen, sondern behinderten sogar die hirneigene Fähigkeit zur Clearance von abnormalen Proteinen (ADAPT Research Group 2007). In den meisten der kürzlich durchgeführten klinischen Studien hat die Behandlung mit NSAIDs ebenfalls keinen Erfolg gezeigt (HO et al. 2006). Auch die Arbeitsgruppe um EL KHOURY (2007) rät zur Vorsicht beim therapeutischen Einsatz nicht selektiver Antiphlogistika und weist darauf hin, dass eine chronische Unterdrückung des Chemokinrezeptors *Ccr2* sowie von Mikroglia durch Langzeitapplikation von NSAIDs die Progression der Alzheimerschen Erkrankung beschleunigen kann.

Die ideale antiinflammatorische Substanz in der Behandlung der AD würde die wahrscheinlich vorrangig durch Mikroglia vermittelte Beseitigung der Amyloid-Plaques nicht beeinträchtigen, aber inflammatorische Prozesse, wie Oxidativ-Stoffwechsel oder Superoxidbildung verhindern, die wiederum aus der mikroglialen Aktivierung folgen (EIKELENBOOM et al. 2000; HAMPEL et al. 2003, BLOCK et al. 2007). Ob Mikrogliazellen an der Amyloid-Clearance maßgeblich beteiligt sind ist derzeit nicht sicher; die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag in dieser Fragestellung leisten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten auf β -Amyloid und dessen Folgeeffekte ausgerichteten Therapieansätze nicht kausal angreifen. Zusätzlich werden „unspezifische“ therapeutische Strategien in der Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung eingesetzt (HARDY & SELKOE 2002; GOLDE 2003; HAMPEL et al. 2003), wie Antioxidantien (ENGELHART et al. 2002), Metallchelator-Bildner (z.B. *Clioquinol*) (MASTERS & BUSH 2000), Endokannabinoide (VOLICER et al. 1997), lipidsenkende Statine (z.B. *Simvastatin*) (FASSBENDER et al. 2001), Hormonersatz-Therapie mittels Östrogenen (z.B. *Raloxifen*) (YAFFE et al. 1998), Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF) (HAMPEL et al. 2003), Apoptose-Inhibitoren und anderen neuroprotektive Agenzien (z.B. *Neotrofin*) (GLASKY et al. 1994).

2.2 Das Borna Disease Virus (BDV)

Bei dem Borna Disease Virus (BDV) handelt es sich um ein neurotropes Virus mit unsegmentiertem Minus-Strang-RNA-Genom, das in einer Reihe von natürlichen und experimentellen Wirten vorrangig progressive, nonpurulente Meningoenzephalomyelitiden hervorruft (JOEST & DEGEN 1911; SEIFRIED & SPATZ 1930; GOSZTONYI & LUDWIG 1984b, BODE 1999). Der Pathogenese liegt ein CD₈-T-Zell-abhängiger Prozess zugrunde. Das Virus selbst ist nicht zytopathogen (HERZOG & ROTT 1980; BILZER & STITZ 1993, 1994). Das Borna Disease Virus ist der Auslöser der Bornaschen Krankheit, die bereits vor 250 Jahren als Kopfkrankheit der Pferde beschrieben wurde. Die Krankheit und das Virus sind nach der sächsischen Kleinstadt Borna benannt worden, wo es 1895 zu einer Endemie unter Pferden eines Kavallerie-Regimentes kam, bei der zahlreiche Tiere starben (KOHL 1896; DÜRRWALD & LUDWIG 1997). Lange Zeit wurde dem Virus eine natürliche Pathogenität lediglich für Pferde und Schafe zugesprochen und das Vorkommen dieses Virus auf endemische Gebiete in Europa beschränkt. Serologische Analysen gaben darüber Aufschluss, dass das Virus eine größere geographische Verbreitung aufweist (STITZ et al. 1995). Des Weiteren ist auch das Spektrum der natürlichen Wirte größer als zunächst angenommen. Da auch der Mensch als natürlicher Wirt diskutiert wird (STITZ & ROTT 1993; CAPLAZI et al. 1994), muss das Borna Disease Virus als ein echtes zoonotisches Agens bewertet werden (STITZ et al. 1993).

Ob das Borna Disease Virus tatsächlich in die Pathogenese psychiatrischer Störungen des Menschen involviert ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Als gesichert gilt, dass Patienten mit neuropsychiatrischen Störungen, insbesondere mit bipolaren Depressionen, eine höhere Seroprävalenz als gesunde Individuen aufweisen. Allerdings weisen humane Antikörper eine überraschend geringe Avidität gegenüber BDV auf, was die diagnostische Bedeutung solcher

serologischer Befunde relativiert (ALLMANG et al. 2001). Auch SCHWEMMLE (2001) stellte den diagnostischen Wert serologischer Assays aufgrund der geringen Avidität BDV-spezifischer Antikörper in Frage, wobei kein Zweifel besteht, dass seroepidemiologisch öfter BDV-spezifische Antikörper in Patienten mit neuropsychiatrischen Störungen gefunden werden, als in Kontrollen. Spezielle Peptidarrays, die die Spezifität BDV-reaktiver Antikörper weiter charakterisierten deuteten an, dass die BDV-spezifischen Antikörper in untersuchten Humansenen doch durch Kontakt mit dem Borna Disease Virus generiert werden (BILLICH 2004). Neben Antikörpern konnten auch BDV-Antigene, Nukleinsäuren und zirkulierende Immunkomplexe in Blutproben von psychiatrischen Patienten nachgewiesen werden, was für eine ätiopathogenetische Rolle des BDV spricht (BODE & LUDWIG 2003).

Ein spezielles Charakteristikum der Bornaschen Krankheit stellt die sehr lange Inkubationszeit dar, weshalb BDV zu den „slow virus infections“ gezählt wird. Das Virus zeichnet sich insbesondere durch intranukleäre Replikation und Transkription aus; die neurodegenerative Wirkung beruht auf der Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion, die Major Histocompatibility Complex-I (MHC-I)-restringiert ist (RUBIN et al. 1993; HALLENSLEBEN et al. 1998) (siehe 2.2.3). Das Borna Disease Virus weist einen starken Neurotropismus auf und nutzt Nervenbahnen, um zentripetal ins Gehirn zu gelangen (ROTT & BECHT 1995).

2.2.1 Borna Disease Virus – eine immunvermittelte Erkrankung

Nach experimentellen BDV-Studien an Ratten wurde ein T-Zell-vermitteltes, immunpathologisches Geschehen für die BDV-Pathologie angenommen (LUDWIG et al. 1988; STITZ et al. 1995), welches durch Studien an immundefizienten Tieren bestätigt wurde. Demnach führten BDV-Infektionen an athymischen Ratten sowie an Ratten, die immunsupprimierend mit *Cyclophosphamid* oder *Cyclosporin A* behandelt worden waren, weder zu entzündlichen Reaktionen noch zur Entwicklung einer symptomatischen BDV-Erkrankung (NARAYAN et al. 1983b; HERZOG et al. 1985; STITZ et al. 1989). Der Transfer von Milzzellen aus einer BDV-infizierten Ratte in immunsupprimierte Empfängertiere führte zu inflammatorischen Veränderungen im Gehirn und damit einhergehend zu einer klinischen BDV-Erkrankung der immunsupprimierten Tiere (NARAYAN et al. 1983b). Ein Transfer von Immenserum führte jedoch nicht zu einer Erkrankung, was die Beteiligung von Antikörpern am BDV-induzierten immunpathologischen Prozess relativiert (HIRANO et al. 1983).

In den vorrangig perivaskulär auftretenden, inflammatorischen ZNS-Infiltrationen sind sowohl CD₄- als auch CD₈-T-Zellen zu finden. CD₈-T-Zellen agieren als eigentliche Effektor-Zellen im BDV-induzierten immunpathologischen Geschehen; die Eliminierung dieser MHC-I-restringierten T-Zellen verhindert sowohl die BDV-induzierten neurologischen Symptome als auch die histopathologischen Veränderungen im Gehirn (STITZ et al. 1991, 1992; PLANZ et al. 1993; BILZER et al. 1994; SOBBE et al. 1997).

Das Auftreten hochgradiger perivaskulärer aber auch parenchymaler CD₄- und CD₈-T-Zellinfiltrationen im Gehirn korreliert zeitlich mit dem Einsetzen klinischer Krankheitssymptome (NARAYAN et al. 1983b; STITZ et al. 1989; PLANZ et al. 1995).

Für eine direkte neurotoxische Wirkung des BDV sprechen hingegen das Auftreten fataler BDV-Verläufe beim Pferd ohne *post mortem* nachweisbare Inflammation im Gehirn sowie funktionelle Störungen im Signaltransduktions- und Neurotransmitterbereich durch virale

Proteine (BODE 1999). Pathomechanismen dieser direkten Interaktion des BDV mit ZNS-Funktionen könnten eine Rezeptorblockade der postsynaptischen Membran durch Virusbausteine im Sinne einer kompetitiven Hemmung oder Interaktionen mit den sogenannten „Second Messenger“-Systemen (SNYDER 1986) bzw. via Zyto- und Chemokinrezeptoren, die ebenfalls an der Neurotransmission mitwirken, darstellen (GOSZTONYI & LUDWIG 1984a; BODE et al. 1996; LUDWIG & BODE 1997; DIETRICH et al. 1998). Aus Sicht dieser Befunde erscheinen die immunpathologischen Reaktionen eher als Sekundärphänomene, die durch das experimentelle Design, nämlich hohe Infektionsdosen und artifiziellen Infektionsweg, bevorzugt auftreten (BODE 1999).

Die tierexperimentell untersuchten Lern- und Gedächtnisstörungen stützen die Hypothese, dass die BDV-Infektion mit dem für die Gedächtnisbildung essentiellen Glutamatsystem hippokampaler Neuronen interagieren könnte (BODE 1999). Diese Annahme basiert auf den nahezu identischen Verteilungsmustern von BDV-Antigenen und Glutamatrezeptoren im Hippokampus von persistent infizierten Ratten (PTI-NB) (GOSZTONYI & LUDWIG 1984a, 1995). Diese Ratten zeigten leichte Störungen in emotionalen und kognitiven Fähigkeiten trotz fehlender Reaktion des Immunsystems, wobei auf die Modell- und altersabhängige unterschiedliche Reaktivität des Immunsystems nach BDV-Infektion hinzuweisen ist (NARAYAN et al. 1983a, b; CARBONE et al. 1991; BAUTISTA et al. 1994, 1995; STITZ et al. 1995). Auch die Arbeitsgruppe um LIPKIN (1988) beschrieb Neurotransmitterveränderungen durch BDV-Infektionen im Rattenmodell.

2.2.2 Das BDV-Mausmodell

Mäuse sind generell infizierbar. Der klinische Ausbruch und die Schwere der Erkrankung hängen jedoch davon ab, ob und wie stark eine zelluläre Immunreaktion gegen das Borna Disease Virus induziert wird (HALLENSLEBEN et al. 1998). Experimentelle BDV-Infektionen **adult**er Mäuse resultieren nur selten in symptomatischen Krankheitsverläufen. Allerdings gibt es erhebliche Empfänglichkeitsunterschiede gegenüber BDV zwischen den verschiedenen Mäusestämmen, die auf die Allelkonfiguration des *mhc-I* zurückzuführen sind (siehe 2.2.3) (RUBIN et al. 1993; HALLENSLEBEN et al. 1998). Sowohl BDV-erkrankte als auch klinisch gesunde BDV-infizierte Mäuse bilden BDV-spezifische Antikörper. Der klinische Ausbruch und die Schwere der Erkrankung hängen jedoch davon ab, in welchem Maße eine zelluläre Immunreaktion gegen das Borna Disease Virus induziert wird. **Neonatal** infizierte Mäuse vom hochempfindlichen MRL-Stamm entwickeln eine schwere neurologische Erkrankung, die sich sowohl klinisch als auch histopathologisch manifestiert (HALLENSLEBEN et al. 1998). Auch bei Mäusen spielen CD₈-T-Zell-vermittelte immunpathologische Prozesse eine entscheidende Rolle. MRL-Mäuse ohne funktionales β_2 -Mikroglobulin-Gen, die nicht in der Lage sind, intakte MHC-I-Moleküle zu exprimieren, und denen daher CD₈-T-Zellen fehlen (KOLLER et al. 1990; ZIJLSRTA et al. 1990), erkranken trotz hoher intrazerebraler Virus-Belastung nicht (HALLENSLEBEN et al. 1998). Nur wenn das Virus außerhalb des ZNS genügend T-Zellen primen konnte, die dann die Blut-Hirn-Schranke passieren können, entwickelt sich eine ausgeprägte klinische Erkrankung. Bei den neonatal infizierten MRL-Tieren scheint die Virusvermehrung weniger stark auf das ZNS konzentriert zu sein als in adulten Tieren, sodass

bei ersteren eine für das Priming von T-Zellen und damit für die Krankheitsauslösung ausreichende, periphere Antigenpräsentation erreicht wird (HALLENSLEBEN et al. 1998). Die neurotoxische Wirkung in BDV-empfindlichen Mäusen beruht nicht auf direkten zytolytischen Effekten der einwandernden CD₈-T-Zellen. Experimente an knock-out-Modellen haben gezeigt, dass weder Perforin – das als wichtigster zytotoxischer Effektormechanismus der antiviralen Immunantwort von CD₈-T-Zellen gilt – noch Fas/Fas-Ligand-basierte zytolytische Mechanismen wirken (HAUSMANN et al. 2001). Deshalb wird angenommen, dass T-Zell-Zytokine/Rezeptor-Systeme wie TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) aktiviert werden und damit Apoptose-vermittelt zum Neuronenverlust führen (SEDDER et al. 1999; BARBER 2001).

2.2.3 Mausstamm-spezifische Unterschiede in der Empfänglichkeit

Verschiedene Mäusestämme weisen erhebliche Empfänglichkeitsunterschiede gegenüber BDV auf; der klinische Ausbruch und die Schwere einer Erkrankung hängen von der allelischen Zusammensetzung des *mhc-I* ab, während die Prävalenz von weiteren, bisher unbekannten genetischen Faktoren beeinflusst wird (HALLENSLEBEN et al. 1998). Der *mhc-I* ist ein hochpolymorpher Genort, der bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert ist. Die verschiedenen Haplotypen werden in Kleinschreibung bezeichnet (z. B. H-2s, H-2b, H-2k, H-2d). Hochempfindlich sind nur Mäuse mit H-2k-Haplotyp, wie der MRL-Stamm (RUBIN et al. 1993; HALLENSLEBEN et al. 1998). Auch Mäuse der Stämme CBA und C3H, die ebenfalls die H-2k-Allelkombination auf den *mhc-I*-Genen aufweisen, zeigen ebenso schwere klinische Symptome nach BDV-Infektion wie MRL-Mäuse, allerdings erkranken prozentual weniger Tiere klinisch als im MRL-Stamm (HALLENSLEBEN et al. 1998). Mäuse anderer Stämme, wie beispielsweise C57BL/6, die andere Allele auf den *mhc-I*-Genen aufweisen, sind weitgehend resistent gegenüber BDV, da keine zelluläre Immunreaktion bei diesen Tieren induziert wird. SCHAMEL et al. (2001) identifizierten in MRL-Mäusen das hochkonservierte Peptid TELEISSI als immundominantes Epitop des Nukleoproteins p40 des Borna Disease Virus. Dieses Peptid wird über murine MHC-I-Moleküle präsentiert, sodass CD₈-T-Zellen diesen Komplex erkennen können und aktiviert werden.

Tab. 2.2.3: Induktion einer neurologischen Erkrankung nach BDV-Infektion in Abhängigkeit von der Empfänglichkeit des Mausstammes (nach HALLENSLEBEN et al. 1998; neugeborene Mäuse (< 24 h alt) wurden mit je 10 µl BDV-Stamm He/80 intrazerebral infiziert.)

Mausstamm	Haplotyp	Anteil Mäuse mit neurologischen Symptomen (in %)	Schwere der Erkrankung	Alter (in Tagen) beim Einsetzen der Symptome
MRL	H-2k	83	+++	27 - 43
C3H	H-2k	47	+++	32 - 45
BALB/c	H-2d	34	(+)	22 - 42
CBA	H-2k	36	+++	31 - 52
C57BL/6	H-2s	13	(+)	34 - 39

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Material und Geräte

Die verwendeten Lösungen und Substanzen (siehe Anhang I, S. I) wurden, soweit nicht abweichend angegeben, von den Firmen Roth und AppliChem bezogen. In Prozent angegebene Konzentrationen beziehen sich stets auf das Volumen (Volumenprozent).

3.1.1 Geräte und Laborhilfsmittel

- Gefriermikrotom HM 500 OM®, MICROM International GmbH, Walldorf/Baden
- Geiger-Müller-Zählrohr LB 122, Berthold
- Gelelektrophorese-System: Elektrophorese-Kammer, FEBIKON
Gelträgereinheit/Sequenzierungszelle Sequi-Gen, BIORAD
Geltrockner Model 583 Gel Dryer, BIORAD
Stromversorgungsgerät Power Pac 200, BIORAD
- Geldokumentationssystem; Bio Imaging System GENE GENIUS, SynGene
- Kühlzentrifuge Multifuge 3 S-R, Heraeus
- Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100 RT, Canberra-PACKARD GmbH
- Konfokalmikroskop „Axioplan“, Carl Zeiss Jena GmbH
- Mikroskop „Axioskop“, Carl Zeiss Jena GmbH
- Phosphoimaging-System: GS 525 Sample Loading Dock, BIORAD
GS 525 Molecular Imager®, BIORAD
Fluor-STM Multimager, BIORAD
GS 525 Screen Eraser, BIORAD
- Photometer HTS 7000 Bio Assay Reader zur Fluoreszenzsignal-Detektion, PERKIN ELMER
- Sicherheitswerkbank Hera Safe, Heraeus
- Thermocycler DNA Engine PTC-200, MJ Research
- Ultraschallhomogenisator Virsonic Cell Disrupter Model 16-850, Virtis Company, New York
- Ultrazentrifuge SORVALL® Combi Plus, Kendro Laboratory Products
- Vakuumzentrifuge Univapo 150 H, UniEquip, Martinsried

3.1.2 Software

- analySISPro, SIS.Soft-Imaging Software GmbH Münster (histometrische β -Amyloid- Quantifizierung)
- GeneSnap®, SynGen (Geldokumentation RNA+PCR)
- HTS Ole, PERKIN ELMER (ELISA-Auswertung / Photometrie)
- Multi-Analyst®, BIORAD (Phosphoimager-Auswertung)
- Neurolucida®, MicroBrightField, Inc., Colchester, USA (immunhistochemische Quantifizierung)
- Spot 4.0®, Diagnostic instruments, Inc., Sterling Heights, USA (Histologie-Dokumentation)

- VISIONliteTM, ThermoSpectronic (Photometrie)
- Volocity 4.2®, Improvision, Coventry, England (Konfokalmikroskopie)

3.1.3 Virus

Virusstamm 76 von STAEHEL (Freiburg), hervorgegangen aus dem Gießener BDV-Stamm He/80 (FREUDE et al. 2002); verwendet wurde der Überstand eines 10 %igen PBS-Hirnhomogenats der ersten Passage in der Ratte.

Es wurden zur Infektion jeweils 20 µl dieses Homogenats eingesetzt, die insgesamt ca. 5×10^3 focus forming units (FFU) enthielten.

3.2 Versuchstiere

Alle genehmigungspflichtigen, tierexperimentellen Eingriffe wurden im Rahmen des vom Regierungspräsidium Leipzig genehmigten Tierversuchsvorhabens TVV 03/01 durchgeführt. Insgesamt wurden 29 Kontrollmäuse (PBS) und 41 BDV-infizierte Mäuse (Tg2576) untersucht, davon 40 transgene Tiere und 30 Wildtyp-Tiere. Die Tiere wurden unabhängig vom Geschlecht untersucht. Allerdings stellte sich heraus, dass vor allem bei den transgenen Tieren die Männchen labiler waren, als die gleichaltrigen Weibchen und oftmals vorzeitig aus dem Versuch ausschieden. Daher wies die Mehrheit der zu den späten Infektionszeitpunkten untersuchten Tiere weibliches Geschlecht auf. Die Tiere wurden in Klimaschränken mit Tag/Nachtrhythmus bei konstant 23 °C und 56 % Luftfeuchte gehalten. Nach drei Wochen Säugezeit wurden sie abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und mittels Ohrlochmarkierung gekennzeichnet. Ab dem Absetztag wurden die Mäuse einmal pro Woche gewogen, bis sie im Alter von zirka drei Monaten ein stabiles Gewicht von 30 bis 35 Gramm aufwiesen, wobei die hAPP-transgenen Tiere durchschnittlich sechs Gramm leichter waren als ihre Käfiggenossen vom Wildtyp. Die weiblichen Wurfgeschwister wurden durchgehend zusammen in größeren Käfigen gehalten, während die männlichen Wurfgeschwister im Alter von ca. sechs Wochen aufgrund steigender Aggressivität getrennt und in Einzelkäfigen gehalten wurden. Alle Mäuse hatten ad libitum Zugang zu Futter und Wasser.

3.2.1 Transgenes Mausmodell

Die hier verwendete transgene Tg2576-Mauslinie wurde 1995 von Dr. Karen Hsiao, Minnesota, entwickelt und beschrieben (Hsiao et al. 1995, 1996). Diese Maus trägt in ihrem Genom die Sequenz für das *humane amyloid precursor protein (hAPP)* 695 mit der Doppelmutation *lys670-asn* und *met671-leu* (*k670n*, *m671l*) unter Kontrolle des Promoters für das *prion-protein*-Gen vom Hamster (*tg(huapp695.k67n-m671l)2576*).

3.2.2 Transgen-Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis des *happ*-Gens erfolgte mittels PCR nach DNA-Isolierung aus einem ein bis zwei mm langen Mausschwanzbiopstat (HSIAO et al. 1995) in drei Schritten:

1.) DNA-Isolierung mittels Proteinase K und Phenol/Chloroform-Fällung

Die Mausschwanzbioplate wurden zerkleinert und in jeweils 700 µl sterilem Mausschwanz-Puffer sowie mit 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C lysiert.

Anschließend wurden 700 µl frisch hergestelltes Phenol/Chloroform (1:1) pro Probe hinzugefügt, geschüttelt und fünf Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der genomischen DNA wurde in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und mit gleicher Menge Chloroform versetzt, geschüttelt und fünf Minuten bei 16.000 rpm zentrifugiert, um Phenolreste zu eliminieren. Zur DNA-Fällung im Überstand (ca. 500 µl) wurden 1000 µl eiskaltes 100 %iges Ethanol gegeben und die Proben bei 16.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in jeweils 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.) PCR-Ansatz

- Aqua deionis. Steril 12,4 µl
- 10 x PCR-Puffer 2,0 µl
- Nukleotid-Mix 2,0 µl
- Primer 1501 0,4 µl
- Primer 1502 0,4 µl
- Primer 1503 0,4 µl
- Taq DNA Polymerase 0,4 µl
- Genomische DNA aus Schritt 1.) 0,5 µl

Als Negativkontrolle wurde statt der DNA steriles Wasser verwendet. Außerdem wurde eine definiert transgene Probe als Positivkontrolle genutzt.

- Primer 1503 und 1502: Amplifikat humanes (transgenes) APP; Länge: 450 bp
- Primer 1501 und 1502: Amplifikat murines (endogenes) APP; Länge: 750 bp

Tab. 3.2.2.a: Verwendete PCR-Primer (Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH)

Name	Länge	Sequenz	Konz.
1501 (sense)	28 mer	5'-AAG CGG CCA AAG CCT GGA GGG TGG AAC A-3'	10 pmol/µl
1502 (antisense)	29 mer	5'-GTG GAT AAC CCC TCC CCC AGC CTA GAC CA-3'	10 pmol/µl
1503 (antisense)	25 mer	5'-CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGG T-3'	10 pmol/µl

Tab. 3.2.2.b: Übersicht über die Temperaturprofile

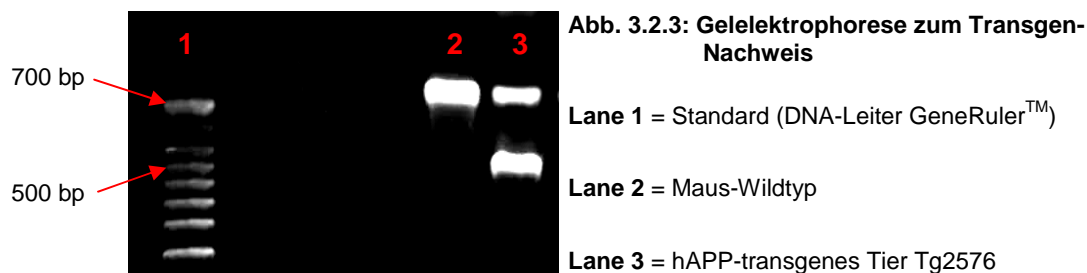
Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
1.) Denaturierung	94°C	5 min.	1
2.) Denaturierung	94°C	45 sec.	35
3.) Primeranlagerung	54°C	45 sec.	
4.) Produktelongation/Polymerisation	72°C	1 min.	
5.) Finale Elongation	72°C	7 min.	1
6.) Lagerung	4°C	∞	/

3.) DNA-Gelelektrophorese und Auswertung mittels Geldokumentationssystem

Für die Auftrennung wurde ein 1 %iges Agarose-TBE-Gel verwendet. Dem flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid (5 µl/100 ml) zur UV-Detektion zugegeben. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet.

10 µl der PCR-Proben wurden in 2 µl DNA-Ladepuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen und für 45 Minuten bei einer konstanten Spannung von 90 Volt (V) elektrophoretisch getrennt. Als Standard wurden 2 µl einer Markersubstanz (GeneRuler™, Fermentas), 2 µl DNA-Ladepuffer und 8 µl Wasser verwendet.

Anhand der Banden wurde bestimmt, welche Tiere neben endogenem *app* auch das humane Transgen tragen. Wildtyp-Tiere zeigten nur eine Bande bei 750 bp (Abb. 3.2.3).



3.2.3 BDV-Infektion

Transgenen Mäusen sowie nicht transgenen Kontrolltieren wurden zu unterschiedlichen *Infektionszeitpunkten* (14 Tage post natum (p.n.), 11 Monate p.n., 13,5 Monate p.n. und 18 Monate p.n.) mittels Hamilton-Spritze unter Ether-Kurznarkose 20 µl Borna-Virus Stock 76

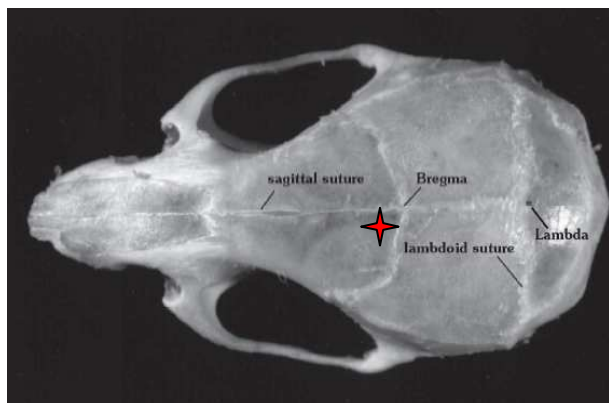


Abb. 3.2.4: Die dorsale Fläche des Mausschädels mit den Referenzpunkten Bregma und Lambda.

Roter Stern: Injektionsstelle.

Aus: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (PAXINOS & FRANKLIN 2001)

(Überstand eines 10 %igen Hirnhomogenats) paramedian in die linke Hirnhemisphäre rostral von Bregma (roter Stern) injiziert. Für die intrazerebrale Infektion war eine Schädeltrepanation notwendig, die in Injektionsvollnarkose (Hypnomidate®; 1 ml pro 60 g KGW) und zusätzlicher Lidocain-Lokalanästhesie durchgeführt wurde. Eine Ausnahme bildeten die mit 14 Lebenstagen infizierten Mäuse, bei denen die Infektion aufgrund des geringen Verknöcherungsgrades als direkte Injektion lediglich unter Ether-Kurznarkose durchgeführt werden konnte.

Als nicht infizierte Kontrolltiere dienten hAPP-transgene Mäuse sowie nicht transgene Tiere, die parallel zu den oben genannten Infektionszeitpunkten mit 20 µl steriler 0,1 M PBS-Pufferlösung (pH 7,4) in die linke Hirnhemisphäre scheininfiziert wurden.

3.2.4 Überlebenszeiten und Gruppengrößen

Sowohl BDV-Tiere als auch nicht infizierte Kontrolltiere, die mit 14 Lebenstagen infiziert wurden, wurden zwei, vier und 14 Wochen nach der Infektion getötet und untersucht.

Tiere, die erst in höherem Alter, also mit 11 Monaten, 13,5 Monaten und 18 Monaten infiziert wurden, wurden vier Wochen nach der Infektion untersucht.

Infektionszeitpunkt	Überlebenszeiten					
14 Tage p.n.	Zwei Wochen p.i.		Vier Wochen p.i.		14 Wochen p.i.	
	Schein	BDV	Schein	BDV	Schein	BDV
	1 wt 1 tg	1 wt 2 tg	1 wt 1 tg	2 wt 2 tg	2 wt 2 tg	3 wt 2 tg
11 Monate p.n.	Vier Wochen p.i.					
	Schein			BDV		
	3 wt 4 tg			3 wt 5 tg		
13,5 Monate p.n.	Vier Wochen p.i.					
	Schein			BDV		
	3 wt 5 tg			3 wt 5 tg		
18 Monate p.n.	Vier Wochen p.i.					
	Schein			BDV		
	2 wt 3 tg			2 wt 6 tg		

**Tab. 3.2.4: Gruppen-
größen**

Legende:

**Schein = Nicht infizierte
Kontrolltiere**

**BDV = BDV-infizierte
Tiere**

p.n. = post natum

**p.i. = post
infectionem**

wt = Wildtyp-Tiere

**tg = hAPP-trans-
gene Tiere**

3.2.5 Gewebepräparation

Zu den oben genannten Überlebenszeiten post infectionem wurden die Tiere durch eine überdosierte Ketamin (80 µl/Tier) / Xylazin (20 µl/Tier)-Narkose getötet. Mit Hilfe einer Perfusionspumpe wurde eine intrakardiale Perfusion mit sterilem PBS-Puffer, pH 7,4 vorgenommen. Die Tiere wurden dekapitiert, das Gehirn aus der Schädelhöhle freipräpariert und vorsichtig entnommen.

Anschließend erfolgte eine mediane Trennung in linke und rechte Hirnhälfte. Aus den linken Hirnhälften von Tieren des frühen Infektionszeitpunktes (14 Tage p.n.) wurden für die RNA-Präparation ein frontoparietales Kortex-Areal, sowie die Regionen Hippokampus und Kleinhirn präpariert und bei -80 °C gelagert. Nach der RNA-Präparation erfolgte der RNase Protection Assay (RPA) zur Untersuchung der Zytokinmuster (siehe 3.3.6).

Aus den linken Hirnhälften von Tieren der Infektionszeitpunkte 11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate wurden für die βA4-ELISA-Präparation (siehe 3.3.5) ein frontoparietales Kortex-Areal sowie die Region Hippokampus präpariert und ebenfalls bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die rechten Hirnhälften aller untersuchten Tiere wurden in toto für 24 h in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie zur Kryoprotektion über Nacht in 30 %iger Saccharose-Lösung gelagert und dann bei -60 °C in Hexan schockgefroren. Diese Hirnhälften wurden bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3 Untersuchung der Hirnhälften

Untersuchte Hirn-Lokalisationen:

Zum Verständnis der Angaben in den Tabellen und Diagrammen des Ergebnis-Teils (siehe Kapitel 4) und zur besseren Orientierung sei hier eine kurze, schematische Beschreibung der untersuchten Koronal-Schnittebenen (in Bregma-Koordinaten, entnommen aus PAXINOS & FRANKLIN 2001) vorangestellt. Für quantitative Analysen wurden die Koronalschnitte aller drei Schnittebenen in jeweils vier bis sechs Areale eingeteilt und anschließend arealweise ausgewertet und verglichen. Auf diese Weise konnten lokale Besonderheiten und Unterschiede erfasst werden.

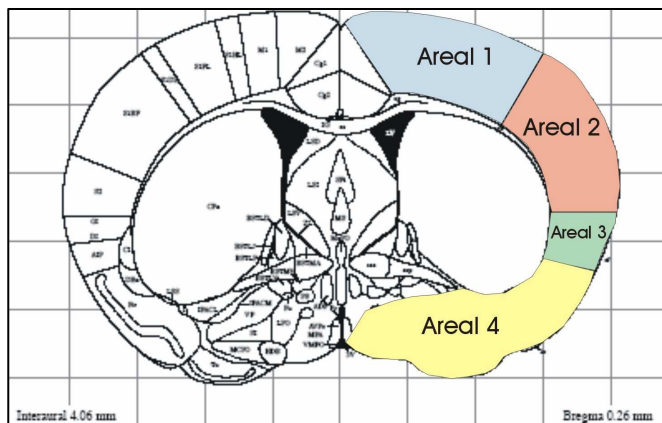


Abb. 3.3.A: Bregma-Ebene 0,26 mm

Rostraler Abschnitt im Bereich des somato-sensorischen Kortex

Areal 1: Primärer und sekundärer motorischer Kortex, Übergang zum primären somatosensorischen Kortex

Areal 2: Primärer und sekundärer somato-sensorischer Kortex

Areal 3: Insulärer Kortex

Areal 4: Piriformer Kortex und präoptische und basale Nuclei

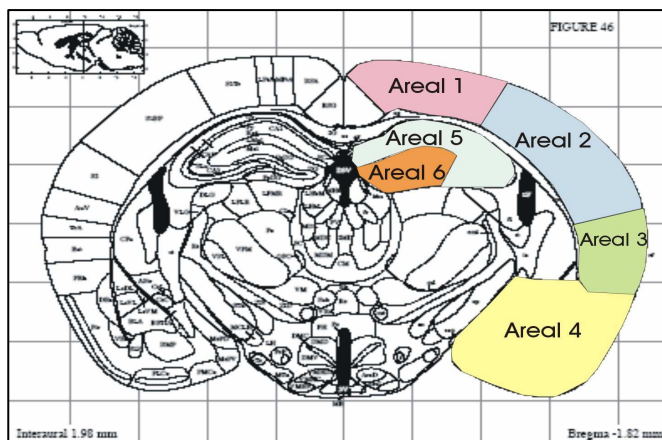


Abb. 3.3.B: Bregma-Ebene -1,82 mm

Mittlerer Abschnitt im Bereich des Hippokampus

Areal 1: Retrosplenialer Kortex und Assoziations-Kortex, Übergang zum primären somatosensorischen Kortex

Areal 2: Primärer und sekundärer somato-sensorischer Kortex

Areal 3: Ekto- und perirhinaler Kortex

Areal 4: Piriformer Kortex und Amygdala

Areal 5: Hippokampus

Areal 6: Gyrus dentatus

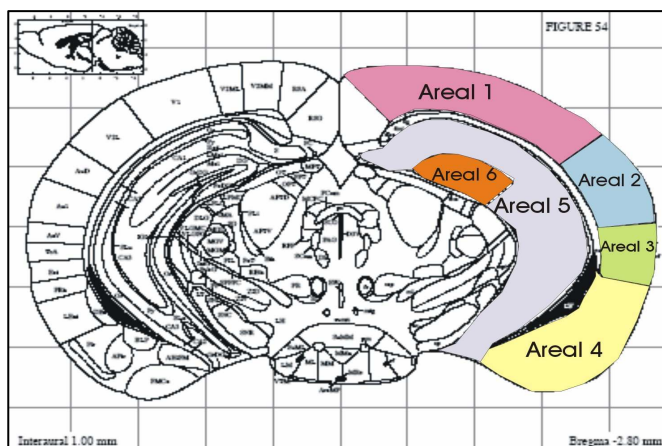


Abb. 3.3.C: Bregma-Ebene -2,8 mm

Kaudaler Abschnitt im Bereich des visuellen Kortex

Areal 1: Retrosplenialer Kortex, primärer und sekundärer visueller Kortex

Areal 2: Primärer und sekundärer auditorischer Kortex

Areal 3: Ekto- und perirhinaler Kortex

Areal 4: Entorhinaler und piriformer Kortex, amygdalo-hippokampales Areal

Areal 5: Hippokampus

Areal 6: Gyrus dentatus

3.3.1 Immunhistochemische Untersuchung der Hirnhälften

Mittels Gefriermikrotom wurden bei -21 °C 30 µm dicke Koronalschnitte der gesamten rechten Hirnhälften angefertigt. Diese wurden frei flotierend in 0,1 M TBS-Puffer, pH 7,4 (TBS) mit Natriumazidzusatz zum Schutz vor mikrobieller Kontamination in Zellkulturplatten gelagert.

3.3.1.1 Standardprotokoll für die Immunhistochemie

Alle Reaktionen wurden an frei flotierenden Schnitten vorgenommen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die immunhistochemischen Reaktionen nach folgendem Protokoll unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode durchgeführt:

- (1) Spülen der Schnitte 5 x 5 min. in TBS zum Entfernen des Natriumazids.
- (2) Blocken von endogener Peroxidaseaktivität durch Inkubation in 1 %igem H₂O₂ in TBS für 10 min. bei Raumtemperatur (RT).
- (3) Spülen der Schnitte 3 x 5 min. in TBS.
- (4) Blocken von unspezifischen Antikörperbindungsstellen durch Inkubation in 5 %igem Ziegennormalserum in TBS (Blockingpuffer) für 1 h bei RT.
- (5) Inkubation mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung im Blockingpuffer bei 4 °C über Nacht (siehe Anhang I, S. I).
- (6) Spülen der Schnitte 3 x 5 min. in TBS.
- (7) Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in TBS für 1 h bei RT (siehe Anhang I, S. I).
- (8) Spülen der Schnitte 3 x 5 min. in TBS.
- (9) Inkubation mit dem Vectastain® Avidin-Biotin-Complex (ABC) für 1 h bei RT (30 min. vor Verwendung ansetzen):
 8 µl Avidin + 8 µl biotinylierte Meerrettich-Peroxidase auf 1 ml TBS
- (10) Spülen der Schnitte 2 x 5 min. in TBS.
- (11) Spülen der Schnitte 1 x 5 min. in 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,6).
- (12) Farbentwicklung in Färbelösung:
 - 5 mg DAB in 10 ml 0,05 M Tris/HCl-Puffer lösen, unmittelbar vor Gebrauch 6 µl 30 %iges H₂O₂ zugeben.
 - Färbung der Schnitte unter Sichtkontrolle
 - Färbedauer je nach Reaktion 5 bis 20 min; es entsteht ein braunes Farbprodukt
- (13) Stoppen der Farbreaktion durch Spülen in TBS.
- (14) Entsalzen der Schnitte durch 2-maliges Spülen in Aqua dest.
- (15) Aufziehen der Schnitte auf Eiweißglycerin-beschichtete Objektträger.
- (16) Auf Wärmeplatte trocknen lassen.
- (17) Equilibrieren der Schnitte im Lösungsmittel (Toluol).
- (18) Eindecken mit Schnelleindeckmittel Entellan auf Toluolbasis.

Alle Inkubations- und Spülschritte wurden auf einem Taumelgerät durchgeführt. Zur Kontrolle des Detektionssystems wurden Schnitte unter Auslassung des Primärantikörper-Schrittes

prozessiert. Als Protokoll-Kontrollen diene Schnittmaterial, in dem die zu detektierenden Strukturen gesichert nachzuweisen sind.

3.3.1.2 Nachweis des viralen Nukleoproteins in Astroglia mittels Doppelmarkierung

Zunächst wurde der Nachweis von GFAP wie unter 3.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Darstellung des viralen Nukleoproteins. Abweichend wurde hier ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Sekundärantikörper in der Konzentration 1 : 200 eingesetzt. Als Chromogen wurde das Fuchsin-System der Firma Dako wie folgt eingesetzt:

- 120 µl Fuchsin-Chromogen
- 120 µl aktivierendes Agens
- 2 ml Färbepuffer

3.3.1.3 Lektinhistochemischer Mikroglia-Nachweis

Zusätzlich zur Immunhistochemie wurde Mikroglia mittels einer Lektinfärbung dargestellt. Dafür wurde das biotinylierte Isolektin B4 „Griffonia simplicifolia“ (GSA) verwendet, das eine Spezifität für α -D-Galactose besitzt. Das Protokoll für die Lektinhistochemie weicht von dem unter 3.3.1.1 beschriebenen Standardprotokoll wie folgt ab:

- (1) Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen (Punkt (4) im Standardprotokoll) entfällt.
- (2) Inkubation mit dem biotinylierten Lektin GSA (Endkonzentration 1 : 20) in 0,1 M PBS-Puffer über Nacht bei 4°C.
- (3) Inkubation mit sekundärem Antikörper (Punkt (7) im Standardprotokoll) entfällt.
- (4) Das Lektin wurde direkt mit dem Avidin-Biotin-Complex detektiert.

3.3.1.4 Antigenwiederherstellung

Die immunhistochemische Detektion von Mikroglia mittels F4/80-Antikörper sowie von β -Amyloid₁₋₄₂ mittels β A₁₋₄₂-Antikörper erforderte jeweils eine Vorbehandlung zur Antigenwiederherstellung: Vor der Verwendung des F4/80-Antikörpers erfolgte eine Proteinase-K-Vorbehandlung. Dem ersten Spülschritt folgend (siehe 3.3.1.1) wurden die Schnitte für fünf Minuten bei 37 °C mit einer Proteinase-K-Lösung (2,5 µg/ml TBS) inkubiert. Nach dem Abstoppen des Verdaus durch dreimaliges Spülen in TBS erfolgte die Weiterbearbeitung entsprechend dem Standardprotokoll.

Für die Antigenwiederherstellung vor dem Einsatz des β A₁₋₄₂-Antikörpers wurden die Schnitte stattdessen für zehn Minuten in 85 %iger Ameisensäure inkubiert. Dieser Schritt diene der Epitopdemaskierung im Bereich der Amyloid-Fibrillen vor der Detektion von β -Amyloid-Peptid.

3.3.2 Darstellung der β -Amyloid-Ablagerungen mittels Thioflavin-S

A.) Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger:

- (1) Waschen der Objektträger in Küvette für 10 min. in Ethanol.
- (2) Waschen der Objektträger in Küvette für 10 min. in 100 % Aceton.
- (3) Für 30 min. unter fließendes Leitungswasser.
- (4) Waschen der Objektträger in Küvette für 10 min. in A. bidest.
- (5) Trocknen über Nacht bei 42 °C.
- (6) Beschichtung der Objektträger:

2 % Gelatine in 50 ml A. bidest., erwärmen, lösen
+ 0,2 % Chromalaun in 50 ml A. bidest
100 ml (1 % Gelatine, 0,1 % Chromalaun), filtriert

B.) Thioflavin-S Färbung:

- (1) Spülen der Schnitte 5 x 5 min. in A. bidest. zum Entfernen des Natriumazids.
- (2) Aufziehen der Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger (siehe oben).
- (3) Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur.
- (4) Waschen der Objektträger 2 x 3 min. in Küvette mit deionisiertem Wasser.
- (5) Inkubation mit 1 % Thioflavin-S-Lösung in deionisiertem Wasser für 20 min. bei Raumtemperatur.
- (6) Abspülen der Thioflavin-S-Lösung mit A. bidest.
- (7) Differenzierung in 80 % Ethanol in Küvette für 35 min. bei Raumtemperatur.
- (8) Trocknen der Objektträger.
- (9) Eindecken der Objektträger mittels Glycerin-Gelatine.

3.3.3 Fluoreszenz-Doppelmarkierung

3.3.3.1 β -Amyloid-Ablagerungen und Mikroglia

Mit dieser Zweifachmarkierung wurden gleichzeitig Thioflavin-S-positive Amyloid-Ablagerungen (siehe 3.3.2) sowie Mikrogliazellen, die mittels F4/80-Antikörper (siehe Anhang I, S. I) detektiert wurden, dargestellt. Die Amyloid-Ablagerungen stellten sich grüngelb (Anregung: 430 nm; Emission: > 455 nm) und die Mikrogliazellen rot (Anregung: 543 nm; Emission: 570 nm) dar.

Nach Epitopdemaskierung mittels Proteinase-K (siehe 3.3.1.4) und Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert (Verdünnung: 1 : 200 in Blockingpuffer). Als Detektionssystem wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper (Verdünnung: 1 : 1000) und Cy3-konjugiertes Extr-Avidin (Verdünnung: 1 : 300 in 1 %igem BSA in TBS) verwendet. Nach Spülen in deionisiertem Wasser und Aufziehen auf gelatinierte Objektträger schloss sich wie beschrieben die Thioflavin-S-Färbung an (3.3.2.B).

3.3.3.2 β -Amyloid-Ablagerungen und Astroglia

Mit dieser Zweifachmarkierung wurden gleichzeitig Thioflavin-S-positive Amyloid-Ablagerungen (siehe 3.3.2) sowie Astrozyten, die mittels GFAP-Antikörper (siehe Anhang I, S. I) detektiert wurden, dargestellt. Sowohl Amyloid-Ablagerungen (Anregung: 430 nm; Emission: > 455 nm) als auch Astrozyten (Anregung: 488 nm; Emission: 508 nm) stellten sich grüngelb dar und wurden rein morphologisch differenziert.

- (1) 4 x 5 min. Spülen in TBS.
- (2) Inkubation mit dem primären Antikörper GFAP in Blockingpuffer 1 : 1000 für 2 h bei Raumtemperatur.
- (3) 3 x 5 min. Spülen in TBS.
- (4) Inkubation mit dem sekundären Antikörper Cy2-Ziege-anti-Kaninchen in TBS 1 : 100 für 1 h bei Raumtemperatur in dunkler Kammer.
- (5) 3 x 10 min Spülen in A. deionis.
- (6) Aufziehen der Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger und über Nacht trocknen lassen.
- (7) Anschließend Thioflavin-S-Färbung wie unter 3.3.2.B beschrieben.

3.3.4 Morphometrische Auswertung

3.3.4.1 Dichte der BDV-infizierten Zellen

Zur Bestimmung der Dichte der BDV-infizierten Zellen in den untersuchten Hirnlokalisationen (siehe 3.3) wurden alle Bo18-markierten Zellen eines Areals in drei Hirnschnitten pro Tier mit Hilfe der Neuronen-Quantifizierungs-Software Neurolucida® ausgezählt (siehe auch Tabelle 4.3.1. aus Anhang II, S. VI bis XVI).

3.3.4.2 Klassifizierung von CD₄- und CD₈-Zellen

Um den Grad der Infiltration von CD₄- und CD₈-T-Zellen in den untersuchten Hirnarealen objektiv einzuschätzen, wurde eine quantitative Klassifizierung nach lichtmikroskopischer Betrachtung vorgenommen:

Grad 0 = Keine CD₄-/CD₈-Infiltrate.

Grad 1 = Keine CD₄-/CD₈-Zellen im Parenchym; ausschließlich vereinzelte und perivaskuläre Zellinfiltrate.

Grad 2 = Mehrere CD₄-/CD₈-Zellen im Parenchym, vorrangig jedoch größere meningeale und perivaskuläre Zellansammlungen.

Grad 3 = Viele, gleichmäßig verteilte CD₄-/CD₈-Zellansammlungen im Parenchym und zahlreiche, dichte, meningeale und perivaskuläre Zellinfiltrate.

3.3.4.3 Klassifizierung der mikroglialen Aktivierung

Zur Untersuchung des Aktivierungsgrades von Mikroglia, der in den untersuchten Hirnlokalisationen der BDV-infizierten Tiere unterschiedlich ausgeprägt war, wurde eine Einstufung des mikroglialen Aktivierungsgrades wie folgt vorgenommen (siehe auch Tabelle 4.3.1. aus Anhang II, S. VI bis XVI):

- Grad 0 = Ausschließlich ruhende Mikroglia-Zellformen entsprechend der Markierung in den nicht infizierten Kontrolltieren; blasse, ramifizierte Zellformen mit langen, dünnen Fortsätzen.
- Grad 1 = Vorrangig ruhende Mikrogliazellen, nur vereinzelt dunklere, deutlicher markierte, abgerundete Zellformen, die auf Aktivierung hinweisen.
- Grad 2 = Aktivierte Mikrogliazellen, gekennzeichnet durch hohe Markierungsdichte, dicken, plumpen, rundlichen Zelleib mit kurzen, dicken, buschig verzweigten Fortsätzen, herrschen vor.
- Grad 3 = Hochgradige mikrogliale Aktivierung; ausschließlich aktivierte Mikrogliazellen mit sehr hoher Markierungsintensität sowie zahlreichen amöboiden Zellformen.

3.3.4.4 Histometrische Quantifizierung der β -Amyloid₁₋₄₂-Markierungsdichte

Zur quantitativen histometrischen Analyse der Amyloid-Ablagerungen wurden pro Tier drei β A₁₋₄₂-markierte Hirnschnitte computergestützt mit der Software „analySISPro“ an einem Videomikroskop untersucht. Unter Berücksichtigung der Hintergrundfärbung wurden Farbschwellenwerte so definiert, dass die Software alle spezifisch DAB-markierten Ereignisse einer fokussierten Region erfassen und als Flächeneinheit in μm^2 angeben konnte. Für definierte Bedingungen (Objektiv, Filter, Belichtung, Kondensoreinstellung, Färbeintensität) wurden Farbschwellenwerte ermittelt und gleichbleibend für diese Bedingungen verwendet. Die so erfassten β -Amyloid-Flächen pro Region bzw. pro Koronalebene wurden summiert und ins Verhältnis zur Gesamtfläche der jeweiligen Region gesetzt, um die relative Fläche der β -Amyloid₁₋₄₂-Antikörper-markierten Areale zu erfassen.

3.3.4.5 Quantitative Auswertung der Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Ablagerungen

Zur Auswertung wurden sowohl die parenchymatösen als auch die perivaskulären fluoreszierenden Signale der transgenen, BDV-infizierten Tiere sowie der transgenen, nicht infizierten Tiere aller Altersgruppen pro Koronalebene (Bregma-Ebene) und pro Hirnareal unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 40x gezählt. Von jedem Tier wurden drei Hirnschnitte ausgezählt. Es wurden lediglich fluoreszierende Ereignisse gezählt ohne Berücksichtigung der Größe der detektierten Strukturen.

Diese Methode der Signal-Quantifizierung wurde von der Arbeitsgruppe um WYSS-CORAY (2001) etabliert, die mit hAPP/TGF- β 1 doppelt transgenen Mäusen arbeitete.

Um trotz der subjektiven Quantifizierungs-Methode möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen, wurden alle Hirnschnitte zweifach ausgezählt und der Mittelwert dieser Zweifachzählungen ermittelt.

3.3.5 Quantifizierung von β -Amyloid-Peptiden mittels ELISA

3.3.5.1 Präparation der Proben

Um zwischen löslichem und fibrillärem β -Amyloid unterscheiden zu können, erfolgte eine Zwei-Schritt-Extraktion nach KAWARABAYASHI et al. (2001). Das präparierte Gewebe von frontalem Kortex und Hippokampus eines Tieres wurde zu einer Probe gepoolt, gewogen und anschließend unter Verwendung von Dilutionspuffer homogenisiert. Der Dilutionspuffer enthielt 2 % SDS, eine Tablette des Proteaseinhibitor-Cocktails „complete™“ sowie 50 μ l Pefabloc sc pro 50 ml doppelt deionisierten Wassers. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation der 15 %igen Homogenate für eine Stunde bei 4 °C mit 29.000 rpm. Im entstandenen Überstand wurden die Konzentrationen der **SDS-löslichen** β -Amyloid-Peptide ermittelt, während im Pellet die **SDS-unlöslichen** β -Amyloid-Peptide gemessen wurden. Dazu wurde das Pellet in 70 %iger Ameisensäure gelöst. Nach kurzer Ultraschallhomogenisation wurde die Ameisensäure durch Zugabe von 1 M Tris-Puffer, pH 11 neutralisiert.

3.3.5.2 Probenmessung

Zur quantitativen Bestimmung der Hauptkomponente der Plaques, des β -Amyloid-Peptids, wurden zwei Immunoassay Kits (Signal Select™) der Firma BioSource verwendet. Die im Kit enthaltenen Zellkulturplatten (96-well) sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der spezifisch an das N-terminale Ende der humanen β -Amyloid-Peptide bindet. Der Detektionsantikörper des einen Kits erkennt das humane **β -Amyloid₁₋₄₀**-Peptid, während der Detektionsantikörper des anderen Kits das humane **β -Amyloid₁₋₄₂**-Peptid detektiert. Der ELISA wurde wie folgt durchgeführt:

Die in den Kits enthaltenen Standards für die Eichkurve wurden auf Raumtemperatur gebracht und im Rekonstitutionspuffer (500 μ l) gelöst. Anschließend wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Proben (siehe 3.3.5.1) im Dilutionspuffer wie folgt verdünnt:

- SDS-lösliche Fraktion: 1 : 21
- SDS-unlösliche Fraktion: 1 : 2

Mit den Standards wurde – laut Vorgaben – eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Zur Vorbereitung der ELISA-Platten wurden die Platten 4 x mit 250 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Platten trocken geschüttelt. Dann wurden jeweils 100 μ l Dilutionspuffer (Leerwert), die Standardverdünnungen sowie die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Proben aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation der Platten bei Raumtemperatur auf der Taumel wurden die Wells geleert und wieder viermal mit jeweils 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Nun wurden die Platten mit dem Detektionsantikörper (100 μ l pro Well) beschickt und für zwei Stunden auf der Taumel bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Wells geleert und viermal mit jeweils 250 μ l Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platten mit 100 μ l alkalische Phosphatase-gekoppeltem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf der Taumel. Anschließend wurden die Wells geleert und wiederum fünfmal mit jeweils 250 μ l Waschpuffer gewaschen.

Nun erfolgte eine Inkubation der Platten mit dem Fluoreszenz-Substrat (30 min. vorher ansetzen; 100 µl pro Well) für 30 min. bei Raumtemperatur auf der Taumel. Die Fluoreszenz-Signale wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm abgelesen und anhand einer in EXCEL erstellten Standarddeichkurve ausgewertet.

3.3.6 Untersuchung der m-RNA-Expression ausgewählter Zytokine

Mittels RNase Protection Assay (RPA) wurde die Expression der Zytokine in den Gehirnregionen frontaler Kortex, Hippokampus sowie Kleinhirn zu den Überlebenszeiten zwei Wochen p.i., vier Wochen p.i. sowie 14 Wochen p.i. des Infektionszeitpunktes 14 Tage untersucht:

Interleukin-12p35 (IL-12p35), Interleukin-12p40 (IL-12p40), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-6 (IL-6), Interferon gamma (IFN- γ) und Macrophage inhibitory factor = Makrophagenmigrations-Hemmfaktor (MIF).

Um die Intaktheit der im Gewebe nachzuweisenden mRNA zu gewähren, ist es essentiell, diese vor der hydrolytischen Spaltung durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNAsen) zu schützen. Aus diesem Grund wurden bei der Arbeit mit RNA stets Handschuhe getragen. Verbrauchsmaterialien, falls nicht produktionssteril, wurden vor Gebrauch autoklaviert. Lösungen wurden mit 1 ml/l Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem potenten RNase-Inhibitor, behandelt und anschließend autoklaviert.

Zunächst erfolgte die Gesamt-RNA-Isolierung mittels RNA-Extraktionslösung TRIzol Reagent® der Firma Invitrogen, entsprechend CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) (Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion).

Die Qualität der RNA wurde mittels denaturierender 37 %iger Formaldehyd / 1,2 %iger Agarosegelelektrophorese in einer Elektrophoresekammer FEBIKON bestimmt; pro 100 ml dieses Formaldehyd-Agarose-Gels wurden 20 µl Ethidiumbromid zugesetzt, um die RNA anschließend im UV-Licht fluoreszierend darzustellen. 5 bis 10 µg Gesamt-RNA wurden im RNA-Probenpuffer aufgenommen und nach dem Denaturieren (5 min. bei 95 °C) auf das Gel aufgetragen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer, pH 7,0 verwendet. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 1,5 Stunden bei einer konstanten Spannung von 80 V.

Die RNA wurde anhand der Qualität der Banden der ribosomalen RNA beurteilt; die Gele wurden mittels Geldokumentationseinheit dokumentiert.

Die Quantifikation und Qualifikation der RNA erfolgte photometrisch durch Messungen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm für jede Probe. Die RNA-Konzentration wurde aus der Extinktion bei 260 nm (optische Dichte) in Abhängigkeit von der eingesetzten Verdünnung errechnet. Der Reinheitsfaktor wurde aus dem Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm berechnet.

3.3.6.1 RNase Protection Assay (RPA)

Für die Durchführung des RNase Protection Assays (RPA) wurde das *In-Vitro*-Transkriptions-Kit mCK-2b der Firma Pharmingen verwendet, das Plasmide für die Detektion der oben

genannten Zytokine sowie – als internen Standard – die konstitutiv exprimierten Gene *L32* und *GAPDH* enthielt. Mittels *in-vitro*-Transkription wurden unter Verwendung von einer T7-Polymerase sowie von [$\alpha^{32}\text{P}$] UTPs [^{32}P]-markierte Antisense-RNA-Sonden von hoher spezifischer Aktivität (3000 Ci/mmol) hergestellt, die zur Hybridisierung mit 12,5 μg Mausproben-mRNA verwendet wurden. Nach dem Hybridisierungsschritt wurden nicht hybridisierte, freie RNA-Proben sowie einsträngige RNA einem Verdau mittels RNAsen unterzogen. Die verbleibenden „geschützten“ (protected) RNA-Fragmente wurden gereinigt und auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

3.3.6.2 Gel-Elektrophorese

Die Gelträgereinheit wurde montiert; Gel-Zusammensetzung:

Substanz		Konzentration
Acrylamid	} Rotiphorese 40®	40 %
Bisacrylamid		2 %
TBE-Puffer		10 x
Harnstoff		48 %
Ammoniumpersulfat		10 %
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)		0,06 %

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurden die Slots mit 0,5 M TBE-Laufpuffer gespült; es wurde ein Vorlauf des Gels für 45 min. bei 40 Watt durchgeführt. Die in Probenpuffer gelösten Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel für drei Minuten bei 90 °C denaturiert. Das erste und letzte Slot des Gels wurde jeweils mit nicht hybridisierten Sonden befüllt, die die Identifizierung der Zytokin-Signal-Banden ermöglichte. Der Gellauf wurde über drei Stunden bei 60 Watt durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier aufgezogen und für zirka eine Stunde im Geltrockner getrocknet. Die Detektion und Auswertung erfolgte mittels Phosphoimaging-System.

3.4 Biostatistische Auswertung

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogrammpaket SPSS 11.5 (SPSS Software-GmbH, München) statistisch ausgewertet.

Die Prüfung auf Normalverteilung der Werte wurde mit dem SHAPIRO-WILK-Test durchgeführt. Da bei den Untersuchungsparametern zu den einzelnen Überlebenszeitpunkten deutliche Abweichungen von der Normalverteilung nachgewiesen wurden (siehe Tabellen 3.4.A, B und C in Anhang III, S. XVII bis S. XIX), wurden der Median und die Perzentile berechnet und verteilungsunabhängige Prüfverfahren angewendet.

Die Prüfungen auf statistische Unterschiede der Untersuchungsparameter – insbesondere des β -Amyloidgehaltes – zwischen Kontroll- und BDV-infizierten Tieren aller drei Altersgruppen wurden mit dem U-Test nach MANN-WHITNEY durchgeführt.

Die Prüfung auf potentielle Zusammenhänge der verschiedenen Untersuchungsparameter wurde durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach SPEARMAN dargestellt.

4 Ergebnisse

Der Ergebnis-Teil gliedert sich in zwei Abschnitte; **Teil 4.1** beschreibt die **Untersuchungen der BDV-induzierten Inflammation** im Gehirn von transgenen Mäusen, in denen die Tiere zu drei verschiedenen Überlebenszeiten (zwei Wochen p.i., vier Wochen p.i. und 14 Wochen p.i.) nach der Infektion mit dem Borna-Virus untersucht wurden. Diese Untersuchungen dienten dazu, den Zeitpunkt nach der Borna-Infektion zu ermitteln, zu dem im Gehirn der infizierten Tiere die Inflammation am deutlichsten ausgeprägt war.

Teil 4.2 beschreibt die eigentlichen **Untersuchungen zur β -Amyloid-Belastung** bei älteren transgenen Tieren, die zum Zeitpunkt der Infektion (11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate) bereits ausgeprägte β -Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen aufwiesen. Vier Wochen p.i. wurde die β -Amyloid-Belastung in den Gehirnen der transgenen, BDV-infizierten Tiere (im Weiteren auch als „BDV-Tiere“ bzw. „BDV-Mäuse“ bezeichnet) sowie von transgenen, PBS-behandelten Kontrolltieren (im Weiteren auch als „scheininfiziert“ bezeichnet) sowohl histometrisch als auch mittels ELISA bestimmt und verglichen.

Jedes Tier wurde einer regelmäßigen klinischen Untersuchung unterzogen und bis zu einem Alter von ca. drei Monaten wöchentlich gewogen. Zu keinem Zeitpunkt konnten klinisch fassbare BDV-spezifische Symptome bei den BDV-infizierten Mäusen festgestellt werden. Es bestanden aus klinischer Sicht keine Unterschiede zu den nicht infizierten Kontrolltieren.

Ebenso zeigten die hAPP-transgenen Mäuse selbst zu den späten Untersuchungszeitpunkten mit 11, 13,5 und 18 Monaten keine für uns erfassbaren Verhaltensauffälligkeiten; sie unterschieden sich lediglich durch ihr geringeres Gewicht und Körpergröße von den Wildtyp-Mäusen.

4.1 Untersuchung der BDV-induzierten Inflammation im Gehirn von transgenen Mäusen

4.1.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei diesen im Höchstfall vier Monate alten Tieren (Überlebenszeit: 14 Wochen p.i.) waren in keiner der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen Unterschiede zwischen den APP-transgenen Tieren und den Wildtyp-Tieren – sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den BDV-infizierten Gruppen – zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurde auf die Kennzeichnung des Genotyps an den Abbildungen verzichtet.

4.1.1.1 Virusnachweis und Virusverteilung in verschiedenen Hirnregionen

Bereits zu der Überlebenszeit (ÜLZ) **zwei Wochen p.i.** war bei allen BDV-infizierten Tieren eine deutliche Virusproteinexpression im gesamten Kortex und im Hippokampus der BDV-infizierten Tiere nachweisbar. Im Kleinhirn war zu dieser Zeit allerdings noch kein BDV-Nukleoprotein nachzuweisen. Alle scheininfizierten Kontrolltiere zeigten lediglich unspezifisch markierte Gefäße, jedoch in keiner Region markiertes Virusprotein.

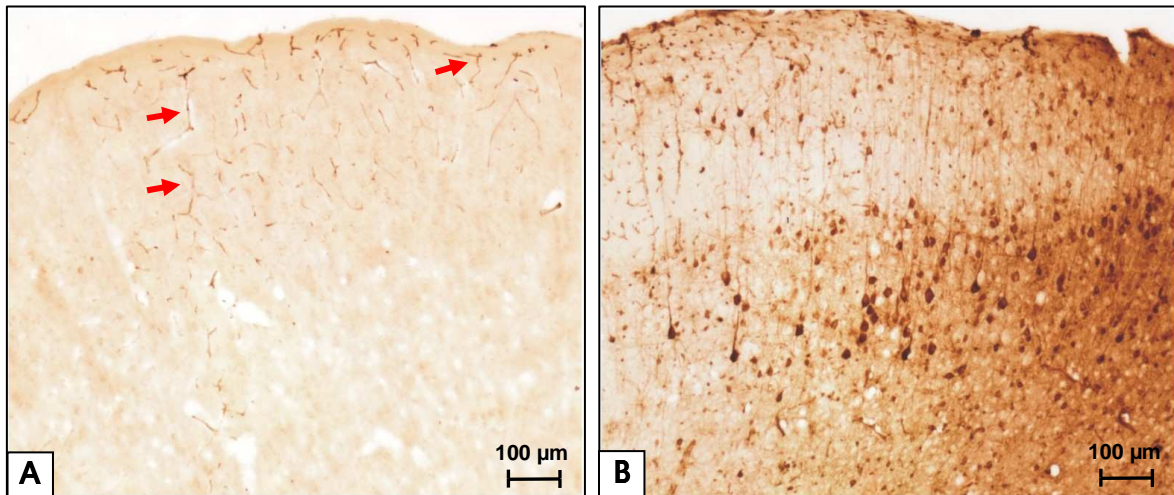


Abb. 4.1.1.1.a: Nachweis von Virusantigenen mit dem monoklonalen Antikörper Bo 18 im Bereich des parietalen Kortex nach einer ÜLZ von zwei Wochen

A: Kontrolltier mit unspezifischer Gefäßmarkierung (siehe Pfeile). **B:** BDV-infiziertes Tier mit zahlreichen BDV-positiven Zellen und Fortsätzen.

Virales Nukleoprotein wurde in allen drei Überlebenszeiten sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten nachgewiesen (siehe Abb. 4.1.1.1.b), jedoch zu keinem Zeitpunkt in Mikrogliazellen.

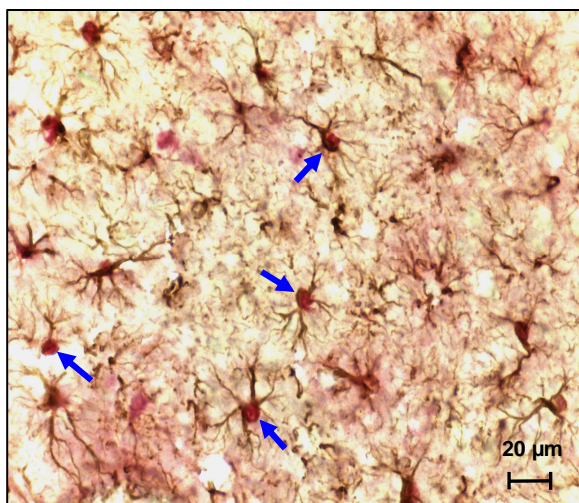


Abb. 4.1.1.1.b: Immunhistochemische Doppelmarkierung von Astrozyten und viralem Nukleoprotein

Viraler Nukleoprotein-Nachweis (rot) mit dem Bo 18-Antikörper in GFAP-markierten Astrozyten nach einer Überlebenszeit von zwei Wochen (Pfeile).

Rot = Virales Nukleoprotein, Bo 18
Braun = Astroglia, GFAP

BDV-infizierte Tiere wiesen ab der Überlebenszeit **vier Wochen p.i.** auch im Kleinhirn Virusprotein-positive Zellen auf; neben den Zellsomata waren auch hier zahlreiche neuronale Fortsätze markiert (siehe Abb. 4.1.1.1.c).

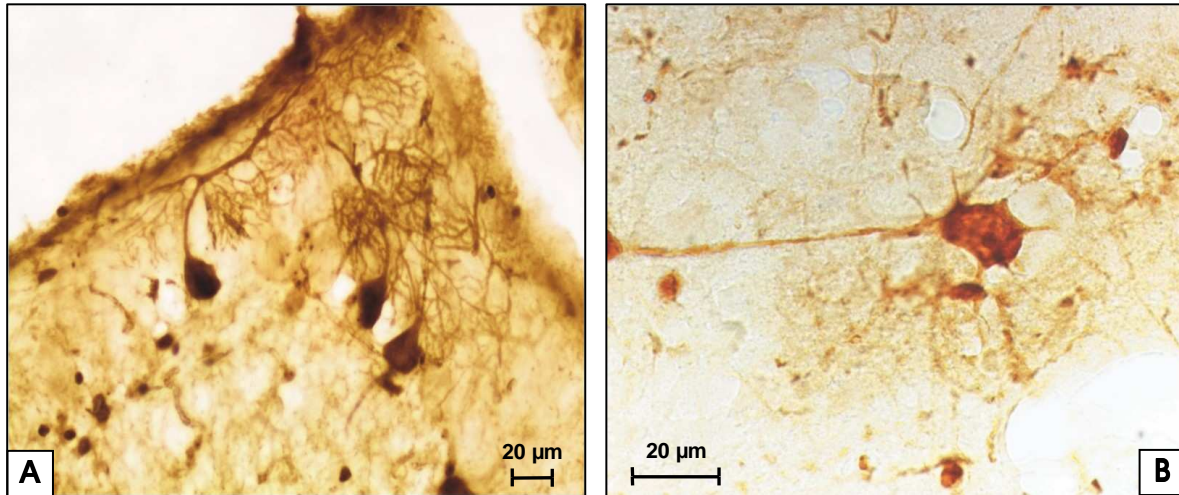


Abb. 4.1.1.1.c : Nachweis von Virusantigen mit dem monoklonalen Antikörper Bo 18 nach einer ÜLZ von vier Wochen p.i.

A: BDV-Nukleoprotein-positive Purkinje-Zellen in der Ganglienzellschicht des Kleinhirns eines infizierten Tieres.

Die geschichtete Markierung von neuronalen Somata ist auf die unterschiedliche Zelldichte in den verschiedenen Kortexarealen zurückzuführen. Es wurden Regionen mit hoher und niedriger Expression von viralem Nukleoprotein beobachtet (siehe Abb. 4.1.1.1.d).

Die Verteilung und die Dichte der Expression des viralen Nukleoproteins von BDV-infizierten Tieren nach einer Überlebenszeit von **14 Wochen p.i.** glich den Befunden zur Expression nach vier Wochen p.i.

Scheininfizierte Kontrolltiere zeigten auch zu diesen Überlebenszeiten wiederum keinerlei Markierung in den untersuchten Hirnregionen.

Zusammenfassend wurde zu keiner Überlebenszeit virales Nukleoprotein in Gehirnen von Kontrolltieren nachgewiesen. Alle BDV-infizierten Mäuse zeigten zu allen drei Überlebenszeiten virale Antigenexpression. Die BDV-infizierten Mäuse der Überlebenszeit vier Wochen p.i. zeigten eine Zunahme sowohl der Anzahl der BDV-infizierten Zellen als auch der Hirnregionen, in denen virales Nukleoprotein nachgewiesen wurde, gegenüber den BDV-infizierten Mäusen der Überlebenszeit zwei Wochen p.i. Zwischen den Tieren der Überlebenszeiten 4 Wochen p.i. und 14 Wochen p.i. wurden keine Unterschiede in der regionalen Markierungsverteilung und -intensität registriert.

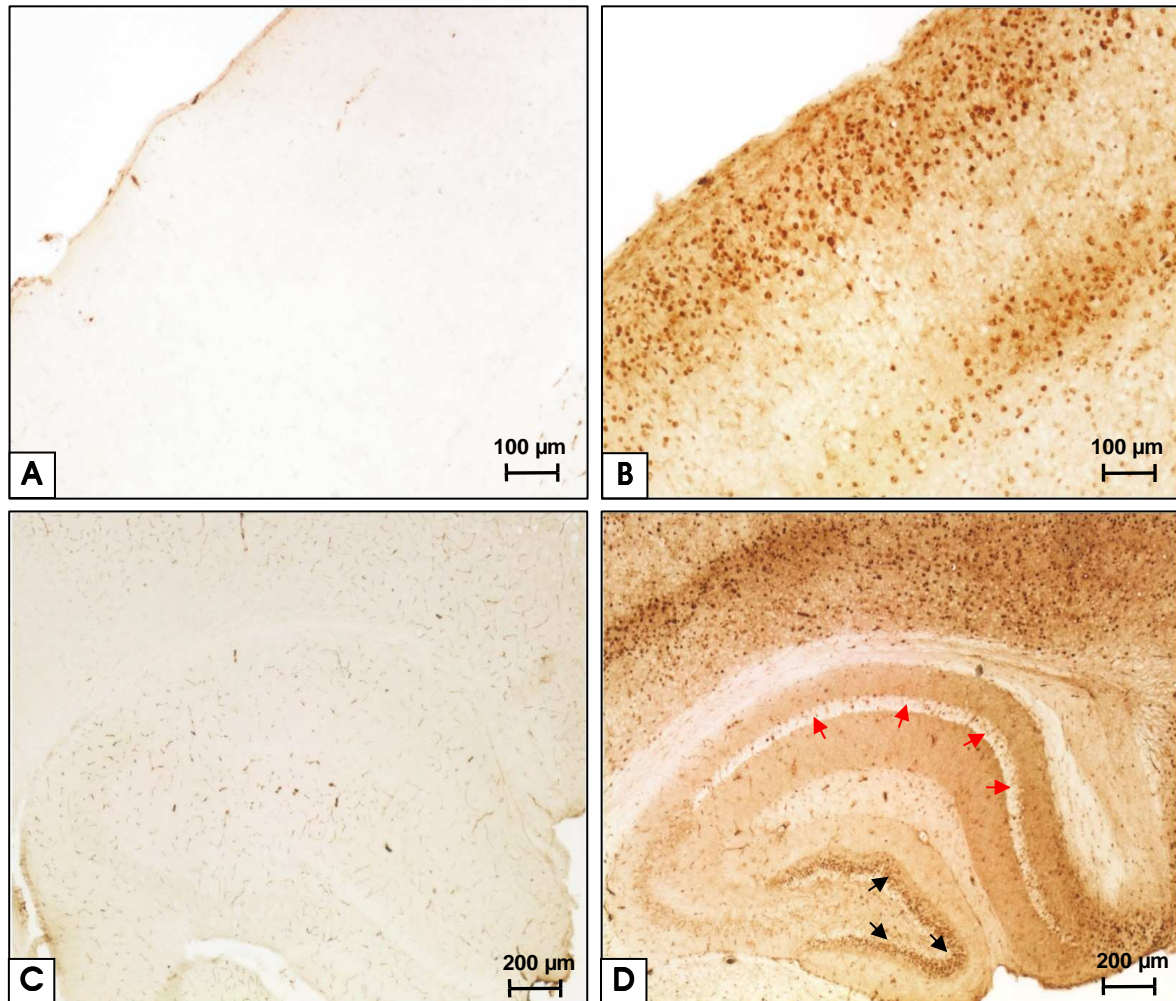


Abb. 4.1.1.1.d: Nachweis von Virusantigenen mit dem monoklonalen Antikörper Bo 18 im parietalen Kortex (A, B) und im Hippokampus (C, D) nach einer ÜLZ von vier Wochen p.i.

A: Kontrolltier ohne spezifische Markierung. **B:** BDV-infiziertes Tier mit geschichteter Markierung von neuronalen Somata und Nachweis von viralem Nukleoprotein in radiär verlaufenden neuronalen Fortsätzen. **C:** Kontrolltier mit unspezifischer Gefäßmarkierung. **D:** BDV-infiziertes Tier mit hoher Expression von viralem Nukleoprotein im Stratum granulosum des Gyrus dentatus (schwarze Pfeile) und niedriger BDV-Nukleoproteinexpression im Stratum pyramidale des Ammonshornes (rote Pfeile).

4.1.1.2 Beurteilung der Virus-induzierten Immunreaktion anhand der lymphozytären Infiltrationen

Zur Charakterisierung der BDV-induzierten Immunreaktion wurden CD₄- und CD₈-T-Lymphozyten mit monoklonalen Antikörpern immunhistochemisch dargestellt.

Bei den scheininfizierten Kontrolltieren konnten zu keiner Überlebenszeit **CD₄-T-Zellen** nachgewiesen werden. CD₄-T-Zellen waren **zwei Wochen p.i.** nur sehr vereinzelt in den Meningen aller BDV-infizierten Tiere zu finden (siehe Abb. 4.1.1.2.a).

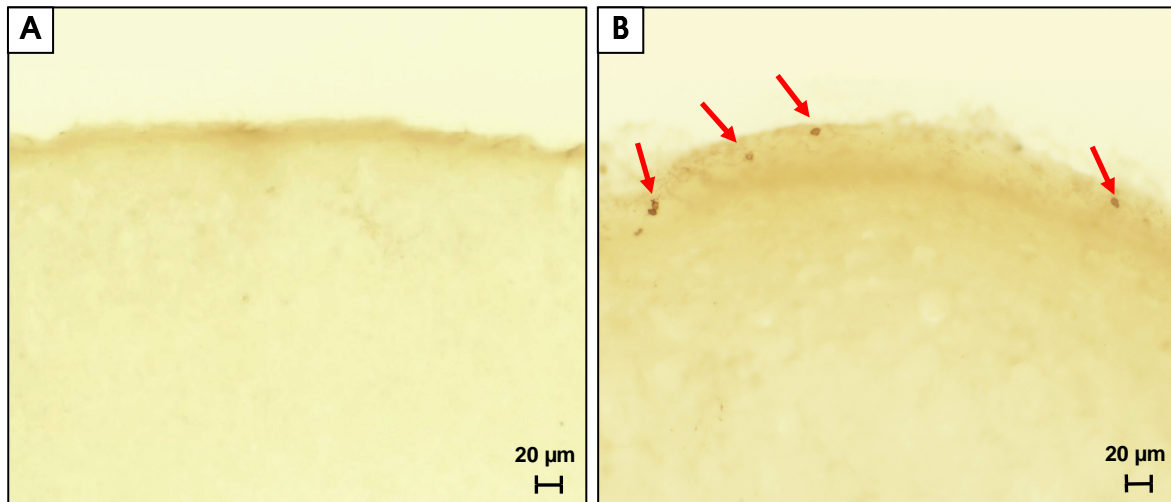


Abb. 4.1.1.2.a: Nachweis von CD₄-T-Zellen mittels monoklonalem Antikörper im Bereich des parietalen Kortex nach einer ÜLZ von zwei Wochen p.i.

A: Kontrolltier ohne CD₄-T-Zellen . **B:** BDV-Tier mit vereinzelt meningealen CD₄-T-Zellen (rote Pfeile).

Nach **vier Wochen p.i.** wiesen alle BDV-infizierten Tiere jedoch deutliche CD₄-T-Zell-Infiltrationen insbesondere in den Meningen, sowie im Hippokampus, im Ventrikelependym und perivaskulär auch im Kortexparenchym auf (siehe Abb. 4.1.1.2.b), sodass sich im histologischen Bild eine nonpurulente Meningoenzephalitis und Perivaskulitis zeigte. Im Kleinhirn der infizierten Tiere fanden sich lediglich fokal CD₄-Zellansammlungen.

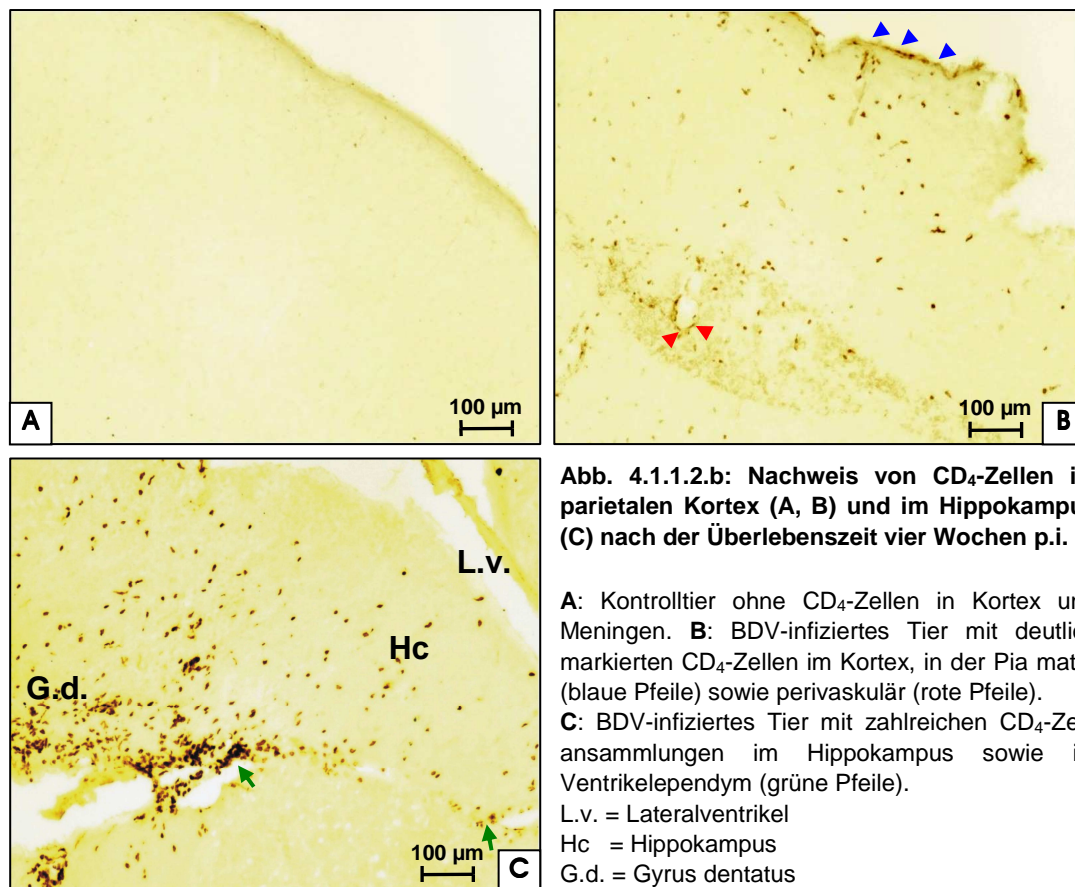


Abb. 4.1.1.2.b: Nachweis von CD₄-Zellen im parietalen Kortex (A, B) und im Hippokampus (C) nach der Überlebenszeit vier Wochen p.i.

A: Kontrolltier ohne CD₄-Zellen in Kortex und Meningen. **B:** BDV-infiziertes Tier mit deutlich markierten CD₄-Zellen im Kortex, in der Pia mater (blaue Pfeile) sowie perivaskulär (rote Pfeile).

C: BDV-infiziertes Tier mit zahlreichen CD₄-Zellansammlungen im Hippokampus sowie im Ventrikelependym (grüne Pfeile).

L.v. = Lateralventrikel

Hc = Hippokampus

G.d. = Gyrus dentatus

14 Wochen p.i. war bei den BDV-infizierten Tieren eine Abnahme der CD₄-lymphozytären Reaktion festzustellen. Es waren nur noch vereinzelt CD₄-Zellen im Bereich der Meningen sowie des Hippokampus zu finden. Allerdings waren keine perivaskulären Zellinfiltrationen mehr vorhanden (siehe Abb. 4.1.1.2.c).

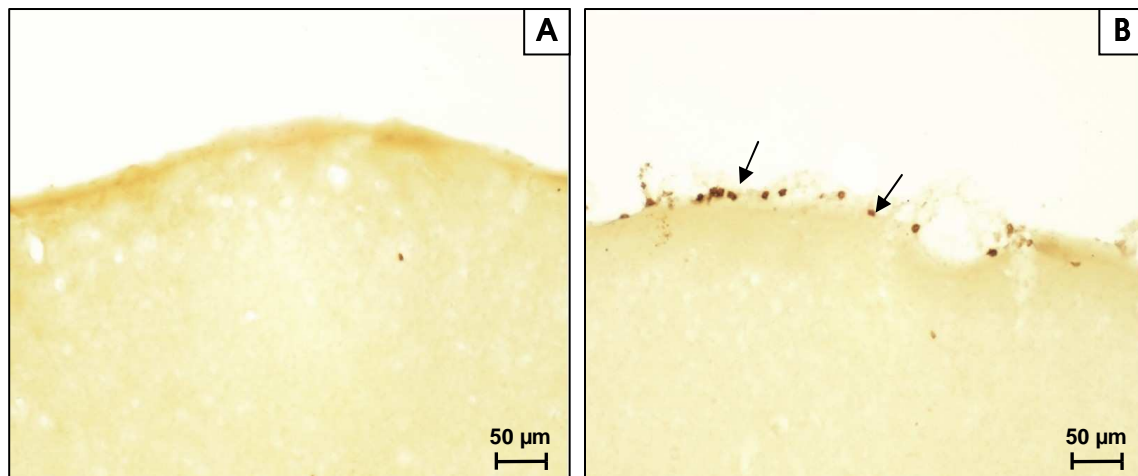


Abb. 4.1.1.2.c: Nachweis von CD₄-T-Zellen im Bereich des parietalen Kortex nach einer ÜLZ von 14 Wochen p.i.

A: Kontrolltier ohne CD₄-Zellen. **B:** BDV-infiziertes Tier mit einzelnen markierten CD₄-Zellen in der Pia mater (Pfeile).

Die Infiltration von **CD₈-T-Lymphozyten** war zu allen drei Überlebenszeiten sehr viel moderater ausgeprägt als die der CD₄-T-Zellen; nach **zwei Wochen p.i.** waren bei den BDV-infizierten Tieren noch keine CD₈-T-Zellen in den Gehirnen zu finden. **Vier Wochen p.i.** konnten einige vereinzelt CD₈-T-Zellen im Kortexparenchym, im Hippokampus sowie meningeal bei den BDV-infizierten Tieren nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1.1.2.d). Nach **14 Wochen** war die CD₈-T-lymphozytäre Infiltration bereits rückläufig. Nur noch vereinzelt waren CD₈-T-Zellen, vorrangig im Hippokampus der BDV-infizierten Tiere, zu finden. Im Gehirn von nicht infizierten Kontrolltieren fanden sich wiederum zu keiner Überlebenszeit CD₈-T-Zellen.

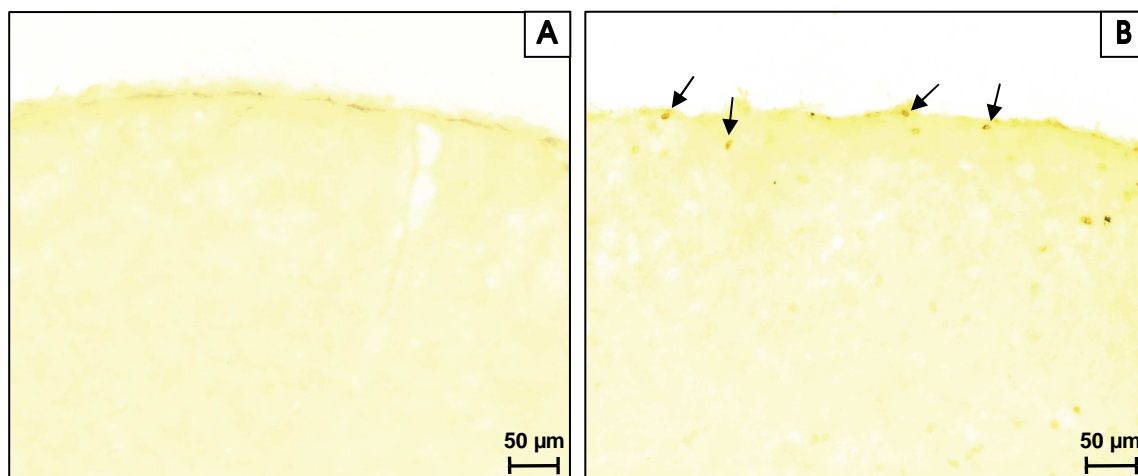


Abb. 4.1.1.2.d: Nachweis von CD₈-T-Zellen im parietalen Kortex nach einer ÜLZ von vier Wochen p.i.

A: Kontrolltier ohne CD₈-Zellen. **B:** BDV-Tier mit sehr vereinzelt, schwach markierten CD₈-T-Zellen im Kortexparenchym und in der Pia mater (Pfeile).

4.1.1.3 Charakterisierung der glialen Reaktion

Die GFAP-Immunhistochemie zur Detektion von **Astrozyten** zeigte in allen untersuchten Regionen ein sehr einheitliches Bild. Kontrolltiere und BDV-infizierte Tiere zeigten zu keiner Überlebenszeit Unterschiede in der regionalen Verteilung, Dichte und GFAP-Expression der Astrozyten. Morphologisch waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen Astrozyten von Kontrolltieren und Astrozyten von infizierten Tieren auszumachen (siehe Abb. 4.1.1.3.a A und B). Auch in Arealen, in denen T-Zell-Infiltrate nachgewiesen wurden (siehe 4.1.1.2), fanden sich keine morphologischen Hinweise auf eine Reaktion der Astroglia.

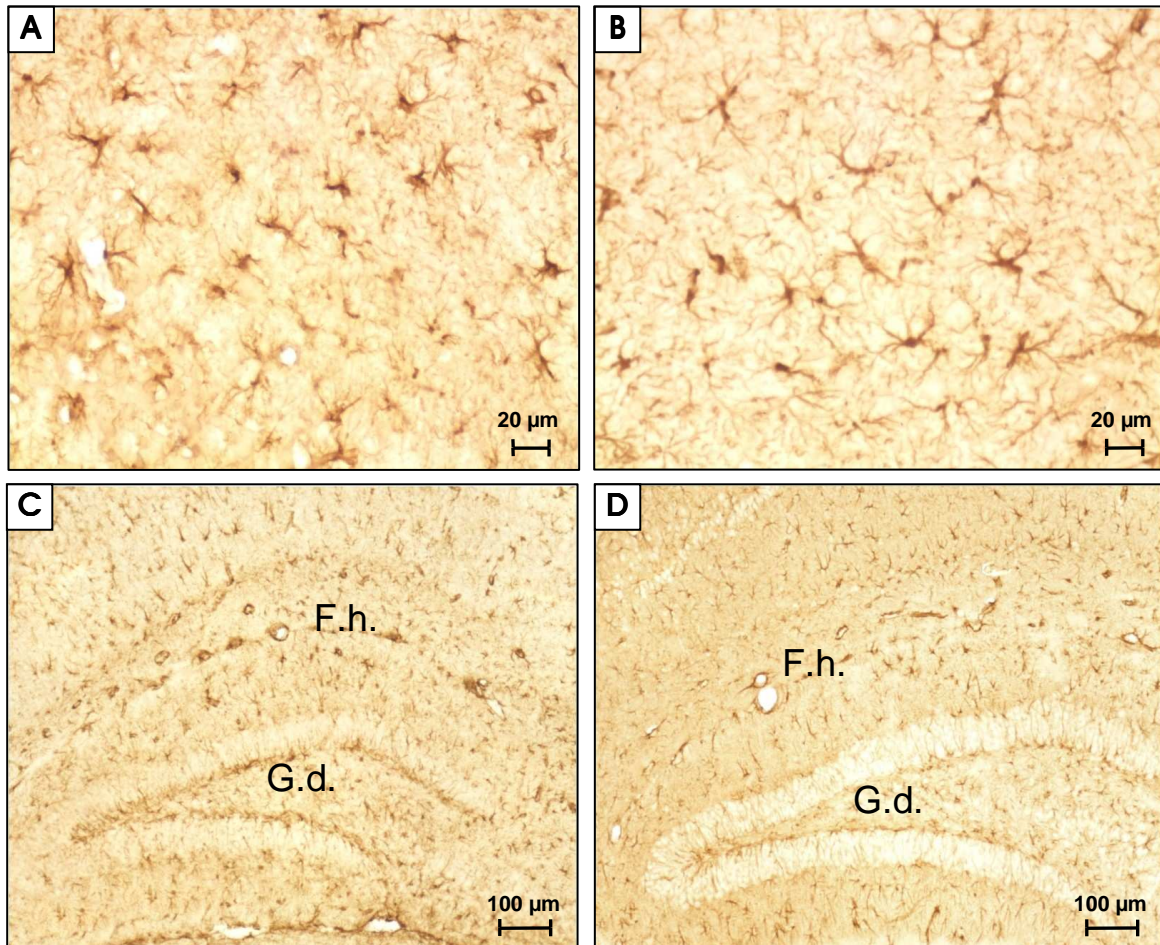


Abb. 4.1.1.3.a: Markierung von Astroglia mittels GFAP-Antiserum im Kortex (A, B) und im Hippokampus (C, D) nach einer ÜLZ von vier Wochen p.i.

Keine Unterschiede in Morphologie, Quantität oder Färbeintensität zwischen Astroglia von Kontrolltieren (A) und BDV-infizierten Tieren (B) im Bereich des somatosensorischen Kortex. Auch im Hippokampus keine quantitativen und morphologischen Unterschiede zwischen markierten Astrozyten von Kontrolltieren (C) und BDV-infizierten Tieren (D). F.h. = Fissura hippocampi G.d. = Gyrus dentatus

Das Griffonia simplicifolia Isolektin B4 (GSA) bindet spezifisch an α -D-Galactose-Moleküle, welche verstärkt von aktivierten **Mikrogliazellen** exprimiert werden, sodass neben den morphologischen Kriterien auch die Färbeintensität und die Markierungsdichte für die Einschätzung des Aktivierungszustands hinzugezogen werden konnten.

Zwei Wochen nach der BDV-Infektion waren neben zahlreichen fibrillär-verzweigten Strukturen (ruhende Mikrogliazellen) nur einzelne GSA-markierte Mikrogliazellen, die einen dunklen, rundlichen Zellkörper mit kurzen, dicken Fortsätzen aufwiesen (aktivierte Mikrogliazellen), im Kortex zu finden (siehe Abb. 4.1.1.3.b).

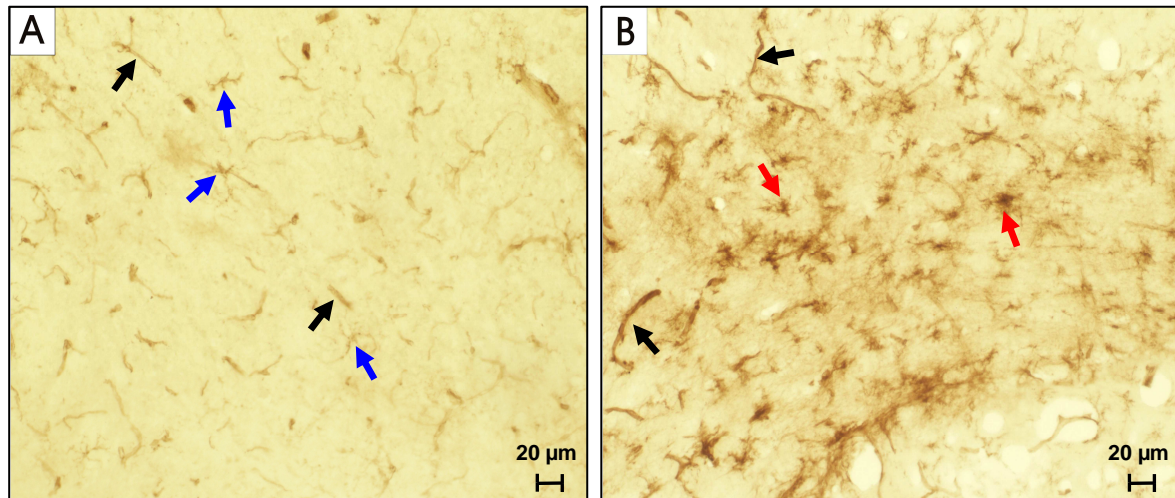


Abb. 4.1.1.3.b: Lektinhistochemische Mikroglia-Markierung mittels *Griffonia simplicifolia* (GSA) im parietalen Kortex nach einer ÜLZ von zwei Wochen p.i.

A: Kontrolltier mit ruhenden Mikrogliazellen (blaue Pfeile). **B:** BDV-Tier mit einzelner Mikroglia-Aktivierung (rote Pfeile). Durch das Lektin markierte Blutgefäße waren sowohl in Kontroll- als auch in BDV-Tieren sichtbar (schwarze Pfeile).

Nach **vier Wochen** wurde bei allen BDV-infizierten Tieren eine deutliche Zunahme der GSA-markierten Zellen - vor allem im perirhinalen Kortex und im Hippokampus - festgestellt. Diese unterschieden sich auch morphologisch und im Grad der GSA-Markierung von Mikrogliazellen in scheininfizierten Kontrolltieren. Sie zeigten eine rundliche Zellmorphologie mit kurzen, buschig verzweigten Fortsätzen (siehe Abb. 4.1.1.3.c B und D). Des Weiteren waren in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere rundliche Zellformen deutlich markiert (siehe Abb. 4.1.1.3.c D; rote Pfeile). Außerdem kam es zu einer deutlich verstärkten Gefäßmarkierung durch das Lektin in den Hirnschnitten der BDV-infizierten Tiere (siehe Abb. 4.1.1.3.c D). Scheininfizierte Kontrolltiere wiesen zu keiner Überlebenszeit aktivierte Mikrogliazellen auf; bei diesen Tieren fanden sich ausschließlich schwach angefärbte, fein verzweigte, fibrilläre ruhende Mikrogliazellen (siehe Abb. 4.1.1.3.c A und C).

Nach **14 Wochen p.i.** waren in den Gehirnschnitten der BDV-infizierten Tiere nur noch sehr vereinzelt aktivierte Mikrogliazellen anzutreffen. Zu dieser Überlebenszeit herrschten wieder ruhende Mikroglia-Formen vor.

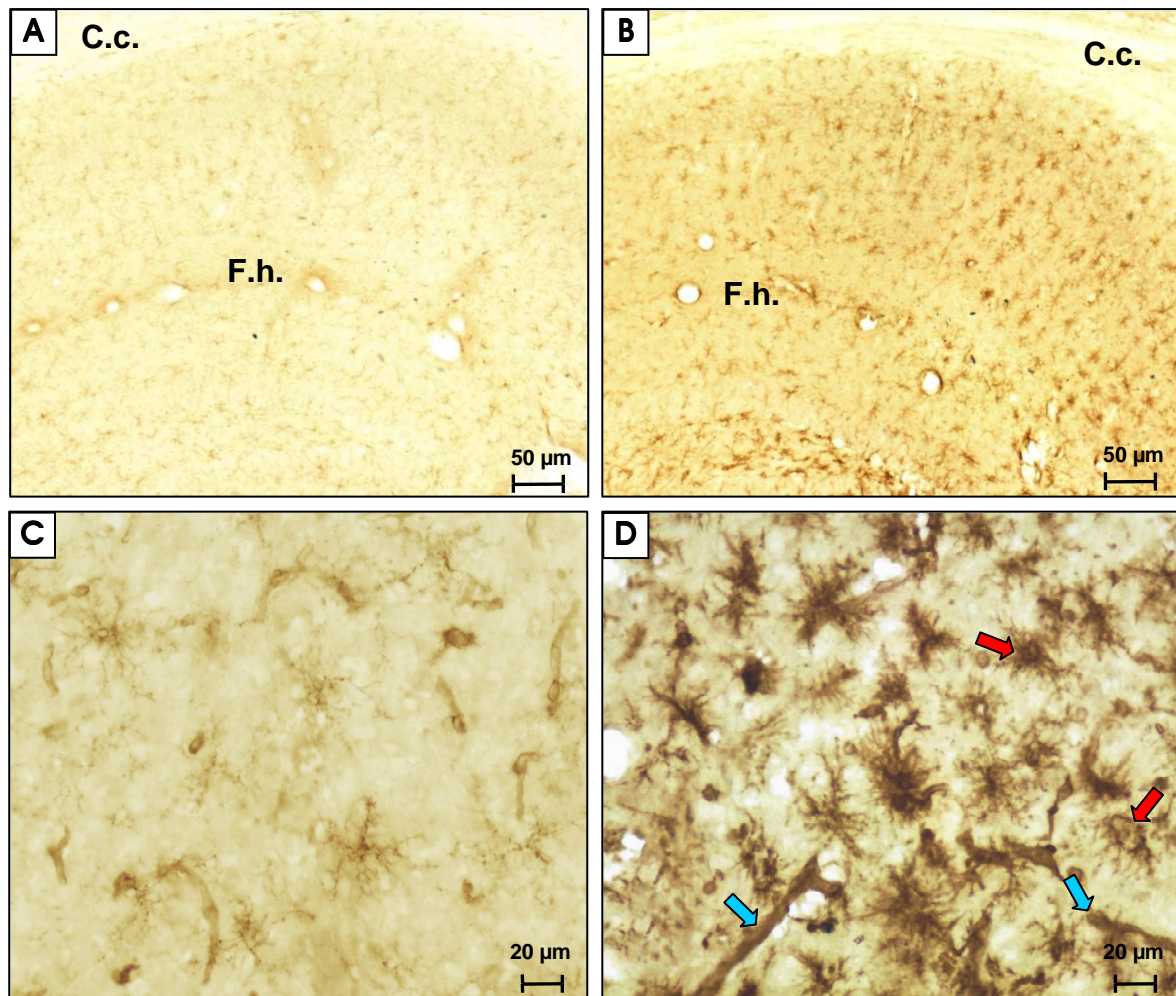


Abb. 4.1.1.3.c: Lektinhistochemische Mikroglia-Markierung mit *Griffonia simplicifolia* (GSA) im Hippokampus (A, B) und im parietalen Kortex (C, D) nach einer ÜLZ von vier Wochen p.i.

Kontrolltiere zeigten nur schwach markierte Mikrogliazellen (A), während BDV-infizierte Tiere deutlich gefärbte Mikrogliazellen aufwiesen (B). Mikrogliazellen der Kontrolltiere stellten sich blass mit schmalem Zellleib und langen, schlanken Fortsätzen dar (C). Aktivierte Mikrogliazellen verfügten nach BDV-Infektion über einen rundlichen, hypertrophierten, teilweise amöboiden Zellleib (rote Pfeile) sowie über kurze Fortsätze; verstärkte Gefäßmarkierung (blaue Pfeile) (D). C.c. = Corpus callosum F.h. = Fissura hippocampi

4.1.2 Charakterisierung der Zytokinexpression zwei, vier und 14 Wochen nach der BDV-Infektion

Mittels RNase Protection Assay (RPA) wurde in den Gehirnregionen frontaler Kortex, Hippokampus sowie Kleinhirn von je drei oder vier BDV-infizierten Tieren und je zwei Kontrolltieren die Expression verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht. Aufgrund der geringen Tierzahlen innerhalb der drei Altersgruppen sowie der schwachen Signalexpression wurde auf eine quantitative densitometrische Auswertung verzichtet.

In allen untersuchten Überlebenszeiten wurde eine konstitutive, Regionen-spezifische Expression von Interleukin (IL)-1 α , IL-12p35, IL-18 und Makrophagen-Migrationshemmfaktor (macrophage inhibitory factor, MIF) registriert.

Bereits **zwei Wochen p.i.** war eine Induktion von Interferon- γ (IFN- γ) im Hippokampus von BDV-infizierten Tieren, nicht jedoch in scheininfizierten Kontrolltieren, zu verzeichnen (siehe Abb. 4.1.2 und Tab. 4.1.2.a).

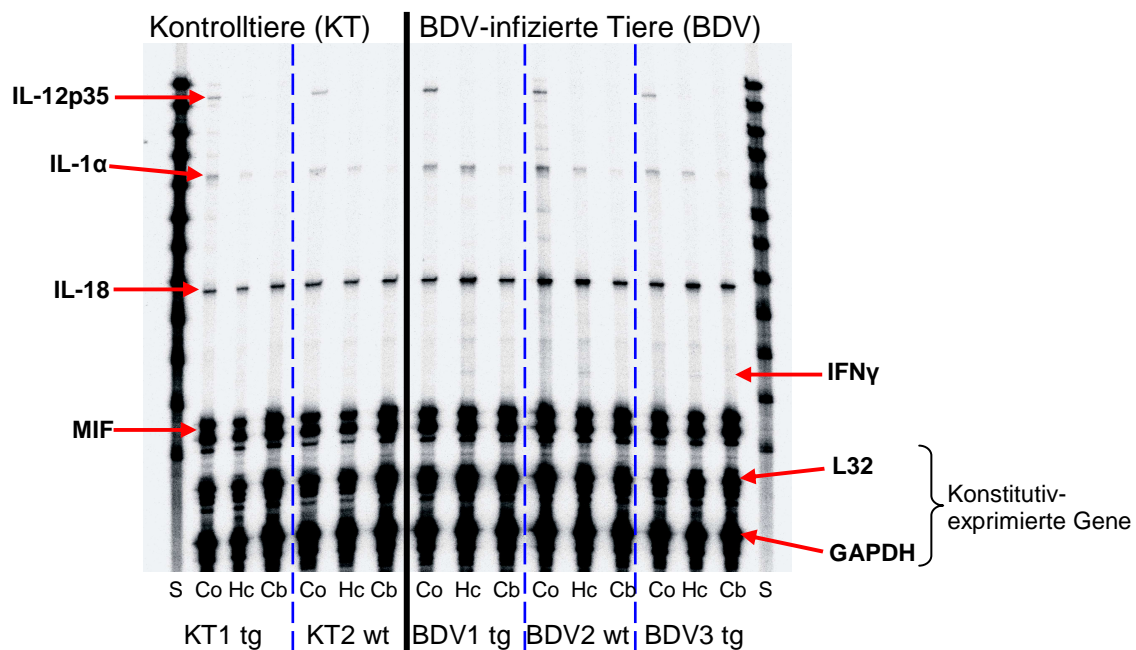


Abb. 4.1.2: Autoradiograph von elektrophoretisch getrennten, α - 32 -P-markierten, RNA-Sonden nach der Überlebenszeit von zwei Wochen p.i.

Nach der Hybridisierung der Gesamt-RNA aus Kortex (Co), Hippokampus (Hc) und Kleinhirn (Cb) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der geschützten Fragmente, die Sequenz-spezifisch für ausgewählte Zytokine sind.

BDV = BDV-infiziertes Tier
KT = scheininfiziertes Tier
tg = transgenes Tier
wt = Wildtyp-Tier
MIF = Makrophagen-Migrationshemmfaktor

IL-12p35 = Interleukin 12, Untereinheit p35
IL-1 α = Interleukin 1 α
IFN- γ = Interferon- γ

S = Standard (nicht hybridisierte Sonden)
L32 = Ribosomenprotein
GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Vier Wochen p.i. wurden in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere neben IFN- γ zahlreiche weitere Zytokine, wie IL-12p40, IL-6, IL-10, IL-1 β und IL-1-Rezeptorantagonist, insbesondere im Hippokampus und im Neokortex exprimiert, während die scheininfizierten Kontrolltiere entweder überhaupt kein Signal oder nur ein schwach erkennbares Signal aufwiesen. Die Expression von IL-1 α war zu diesem Untersuchungszeitpunkt sowohl in BDV-infizierten Tieren als auch in scheininfizierten Kontrolltieren leicht erhöht, wobei die BDV-infizierten Tiere eine tendenziell stärkere Expression aufwiesen (siehe Tab. 4.1.2.a).

14 Wochen p.i. war die Transkriptexpression für IL-1 β und IL-1-Rezeptorantagonist in drei von vier untersuchten BDV-infizierten Tieren in allen untersuchten Hirnregionen immer noch erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Expression von IFN- γ war lediglich im Hippokampus der BDV-infizierten Tiere zu dieser Überlebenszeit noch erhöht (siehe Tab. 4.2.1.a).

Tab. 4.2.1a: Zusammenfassung der Zytokinexpression nach zwei, vier und 14 Wochen p.i.

0 = Keine Veränderung

1 = Zytokinexpression nur in BDV-infizierten Tieren detektiert

2 = Zytokinexpression sowohl in BDV-infizierten als auch in scheininfizierten Tieren detektiert, aber tendenziell stärkere Expression in BDV-infizierten Tieren als in scheininfizierten Kontrolltieren.

Co = Kortex Hc = Hippokampus Cb = Kleinhirn IL = Interleukin

IL-1 Ra = Interleukin-1-Rezeptorantagonist IFN- γ = Interferon- γ

	Zwei Wochen p.i.			Vier Wochen p.i.			14 Wochen p.i.		
Zytokin	Co	Hc	Cb	Co	Hc	Cb	Co	Hc	Cb
IL-1 α	0	0	0	2	2	2	0	0	0
IL-1 β	0	0	0	1	1	1	1	1	1
IL-1Ra	0	0	0	1	1	1	1	1	1
IL-6	0	0	0	1	0	0	0	0	0
IL-10	0	0	0	1	0	0	0	0	0
IL-12p35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-12p40	0	0	0	1	1	1	0	0	0
IFN- γ	0	1	0	1	1	1	0	1	0

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die deutlichsten Veränderungen in der Zytokinexpression **vier Wochen** nach der BDV-Infektion beobachtet wurden.

4.2 Untersuchungen zur Beeinflussung der β -Amyloid-Belastung durch die BDV-induzierte Inflammation

Abgeleitet aus den Resultaten der Untersuchungen zur BDV-induzierten Immunreaktion, die vor Einsetzen der Amyloid-induzierten Inflammation an jungen Mäusen durchgeführt wurden, wurden im zweiten Teil der Untersuchung Mäuse im Alter von 11, 13,5 und 18 Monaten intrazerebral mit dem Borna Disease Virus infiziert und vier Wochen nach der Infektion untersucht.

4.2.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Um den Grad der viralen Infektion zu kontrollieren und um die inflammatorischen Reaktionen auf den Infektionsreiz zu charakterisieren, wurden zu allen drei Überlebenszeiten dieselben immunhistochemischen Untersuchungen wie in den Vorversuchen durchgeführt.

Für den Nachweis der Mikrogliazellen sowie für die Charakterisierung ihres Aktivierungszustandes wurde das in Teil 4.1 verwendete Lektin GSA durch den Antikörper F4/80 ersetzt, da dieser in Vergleichsfärbungen Mikroglia und Makrophagen spezifischer detektiert hatte, ohne zusätzlich Gefäße zu markieren.

Zusätzlich wurden die β -Amyloid-Ablagerungen mit einem gegen βA_{1-42} -Peptide gerichteten Antiserum nachgewiesen und computergestützt histometrisch quantifiziert.

4.2.1.1 Charakterisierung von Virusantigenexpression, T-Zellinfiltraten und glialer Reaktion

Wie in Teil 4.1 wurden bei den immunhistochemischen Untersuchungen der Virusantigen-Expression und der T-Zellinfiltrate ebenfalls keine Unterschiede in der Reaktivität oder in der Färbeintensität zwischen den β -Amyloid-exprimierenden, transgenen Mäusen und den Mäusen vom Wildtyp festgestellt. Diese Parameter waren daher unabhängig vom Genotyp der Tiere. Bei Untersuchungen der glialen Zellpopulationen Astroglia und Mikroglia fanden sich vereinzelt Zellen in unmittelbarer Umgebung der β -Amyloid-Ablagerungen, die auch in scheininfizierten, transgenen Kontrolltieren morphologische Aktivitätsmerkmale aufwiesen (siehe Abb. 4.2.3.2.b). Eine deutliche, großflächige Aktivierung zahlreicher Mikrogliazellen wurde allerdings nur in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere, sowohl bei transgenen Tieren als auch bei Wildtyp-Tieren, registriert.

Sofern nicht anders beschrieben, werden die immunhistochemischen Ergebnisse der drei Altersgruppen 11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate zusammengefasst abgehandelt, da sich überwiegend keine Unterschiede zwischen diesen Altersgruppen manifestierten.

Der immunhistochemische Nachweis von **viralem Nukleoprotein mit dem monoklonalen Antikörper Bo18** erbrachte analog zu den Untersuchungen in Teil 4.1 keinerlei spezifische Markierung von virusbeladenen Nerven- und Gliazellen in den Gehirnen der scheininfizierten Kontrolltiere aller drei Altersgruppen (11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate).

Die Lokalisation der prominentesten Nukleoproteinexpression in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere entsprach der bereits in den Vorversuchen ermittelten und unter 4.1.1.1 beschriebenen Verteilung: Vor allem im Hippokampus und im frontalen Kortex waren Virus-Nukleoprotein-exprimierende Zellen markiert.

Bezüglich der Dichte der markierten Zellen sowie der Markierungsintensität und -lokalisation waren keine Unterschiede zwischen den drei Altersgruppen festzustellen (siehe Abb. 4.2.1.1.a). Allerdings wurden Individual-spezifische Unterschiede in der Bo18-Markierungsintensität zwischen den BDV-infizierten Tieren einer Altersgruppe beobachtet (siehe Abb. 4.2.1.1.b).

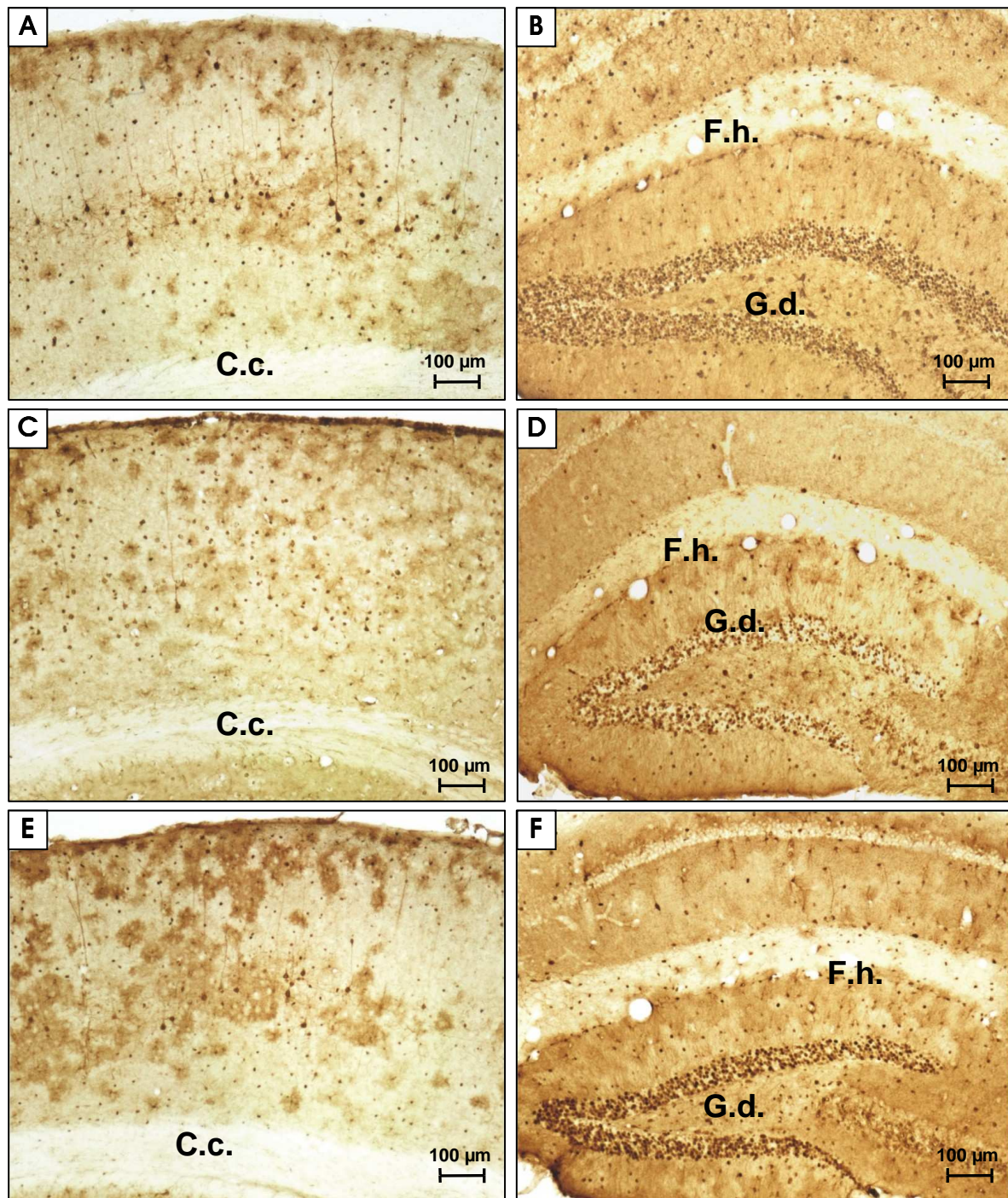


Abb. 4.2.1.1.a: Nachweis von Virusantigen mit dem monoklonalen Antikörper Bo 18.

Vergleich der drei Altersgruppen 11, 13,5 und 18 Monate

BDV-Nukleoprotein-positive Neurone in der Region des somatosensorischen Kortex (**A, C, E**) sowie in den Nervenzellschichten des Gyrus dentatus (**B, D, F**) von mit 11 Monaten (**A, B**), 13,5 Monaten (**C, D**) und 18 Monaten (**E, F**) BDV-infizierten Tieren.

C.c. = Corpus callosum

F.h. = Fissura hippocampi

G.d. = Gyrus dentatus

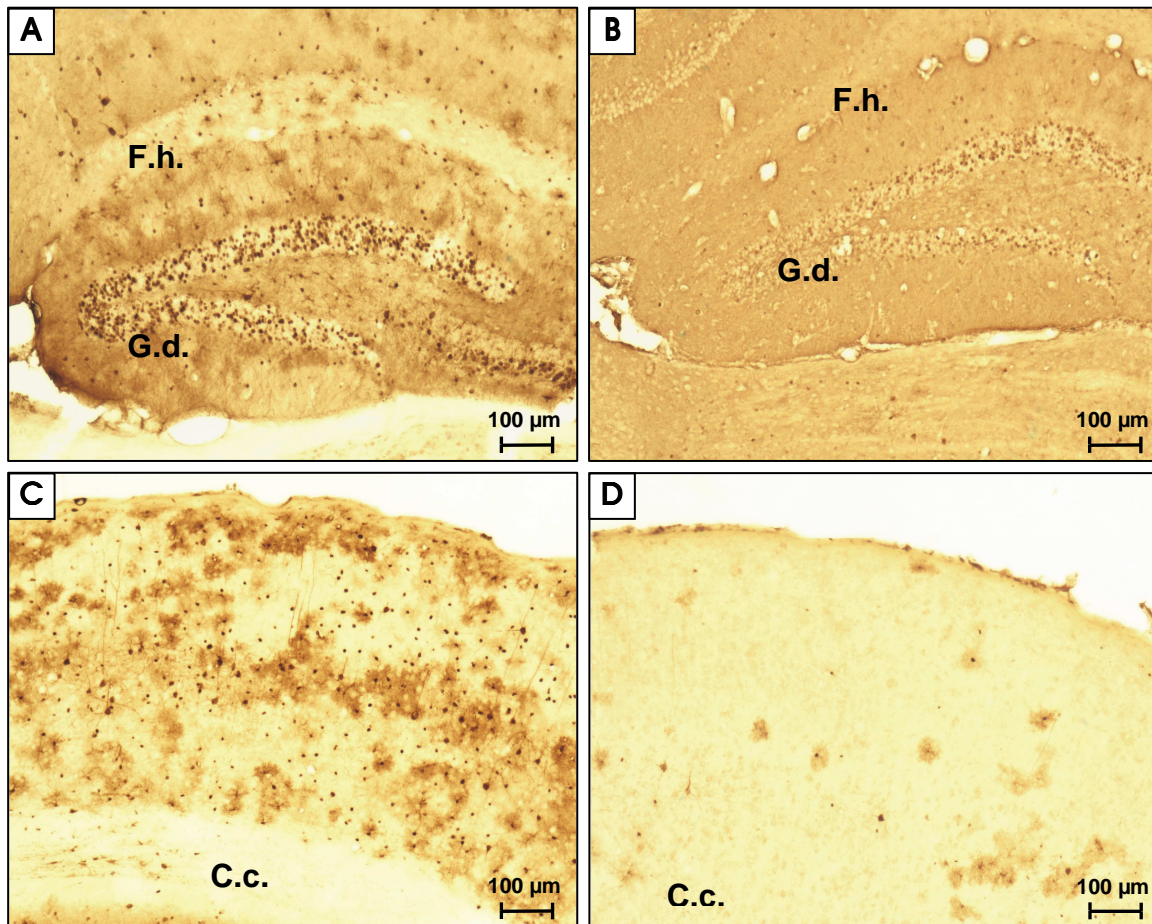


Abb. 4.2.1.1.b: Individuelle Unterschiede in der Bo18-Markierungsintensität

13,5 Monate altes BDV-Tier mit zahlreichen Bo18-markierten Neuronen im Hippokampus (A); BDV-Tier derselben Altersgruppe mit deutlich weniger Bo18-Markierung (B). 18 Monate altes Tier mit vielen markierten Neuronen im somatosensorischen Kortex (C); gleichaltriges Tier mit nur vereinzelter Bo18-Markierung (D) nach BDV-Infektion. C.c.= Corpus callosum F.h.= Fissura hippocampi G.d.= Gyrus dentatus

Auffallend war die Tatsache, dass die im Alter von 11, 13,5 und 18 Monaten BDV-infizierten Tiere deutlich weniger Virusprotein-markierte Zellen aufwiesen, als die BDV-infizierten Tiere, die mit 14 Lebenstagen infiziert worden waren (siehe Abb. 4.2.1.1.c).

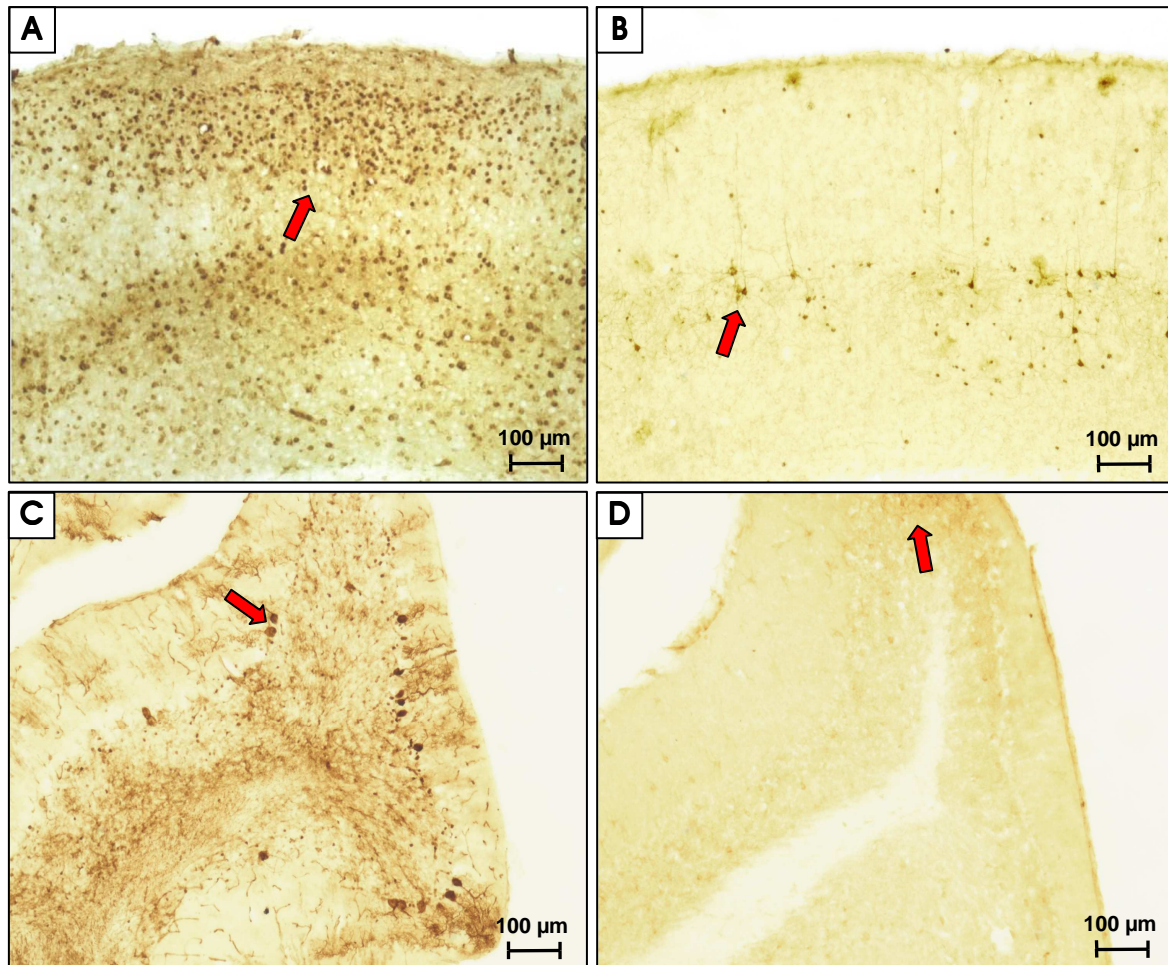


Abb. 4.2.1.1.c: Nachweis von Virusantigen mittels monoklonalem Antikörper Bo 18.

Vergleich von frühem und spätem Infektionszeitpunkt

Hochgradige BDV-Nukleoproteinexpression sowohl im somatosensorischen Kortex (**A**) als auch in der Purkinje-Schicht des Kleinhirns (**C**) von **mit zwei Wochen** BDV-infizierten Tieren vier Wochen p.i. Deutlich weniger Zellen BDV-markiert sowohl im somatosensorischen Kortex (**B**) als auch im Kleinhirn (**D**) (rote Pfeile) von **mit 13,5 Monaten** BDV-infizierten Tieren vier Wochen p.i.

In allen drei Altersgruppen konnten bei den scheininfizierten Kontrolltieren keine CD₄- und CD₈-T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Die im Alter von 11, 13,5 und 18 Lebensmonaten mit dem Borna Disease Virus intrazerebral infizierten Mäuse zeigten bei der Untersuchung ihrer Gehirne vier Wochen p.i. deutliche, mittel- bis hochgradige **CD₄-T-Zellinfiltrationen**. Analog zur Lymphozyten-Lokalisation in den Vorversuchen (siehe 4.1.1.2) waren die CD₄-T-Lymphozyten-Ansammlungen auch hier vorrangig im Hippokampus, in den Meningen sowie perivaskulär zu finden.

Obwohl die Anzahl Nukleoprotein-positiver Nerven- und Gliazellen bei allen drei Altersgruppen regionalerweise deutlich niedriger lag als bei früh infizierten Tieren (siehe Abb. 4.2.1.1.c), wiesen vier von fünf Tieren (bzw. vier von sechs Tieren in der Altersgruppe 18 Monate) dieser Altersgruppen ebenso zahlreiche markierte CD₄-Lymphozyten-Infiltrationen auf. Die Dichte der Bo18-positiven Zellen steht in keinem Bezug zur Stärke der T-Zell-Infiltrationen (siehe Abb. 4.2.1.1.d).

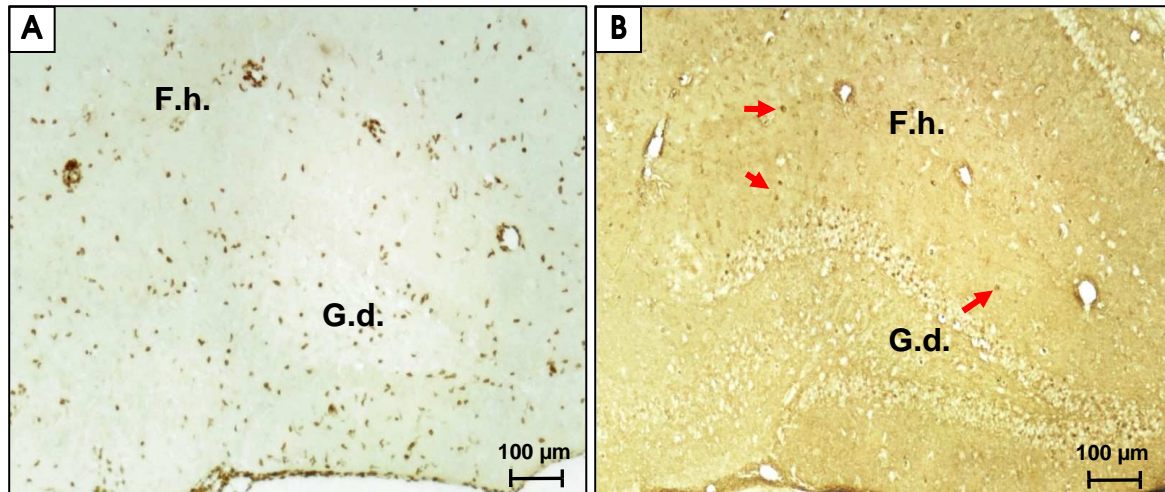


Abb. 4.2.1.1.d: Nachweis von CD₄-T-Lymphozyten und BDV-Nukleoprotein im Hippokampus eines BDV-infizierten Tieres der Altersgruppe 13,5 Monate

Hochgradige parenchymale und vaskuläre CD₄-T-Zellinfiltrationen im Hippokampus (A), obwohl sich im Folgeschnitt nur vereinzelte spezifisch BDV-markierte Zellen (rote Pfeile) in dieser Region fanden (B).

F.h. = Fissura hippocampi

G.d. = Gyrus dentatus

Auch bei den **CD₈-T-Lymphozyten** trat eine vom Grad der viralen Nukleoproteinexpression unabhängige Infiltration in den Gehirnen der mit 11, 13,5 und 18 Lebensmonaten BDV-infizierten Mäuse auf. Die Infiltration dieser Zellen war in Analogie zu den Ergebnissen der Vorversuche viel schwächer ausgeprägt, als die der CD₄-Lymphozyten. Es wurden nur vereinzelte CD₈-T-Zellen – vorrangig perivaskulär und meningeal – gefunden (siehe Abb. 4.2.1.1.e). Wiederum waren Ausmaß und Verteilung der CD₈-Markierung nach BDV-Infektion aller drei Altersgruppen vergleichbar.

An den Gehirnschnitten der BDV-infizierten Tiere sowie der scheininfizierten Kontrolltiere aller drei Altersgruppen wurde mittels **GFAP**-Antiserum die **Astrozytenpopulation** untersucht. Die mit **11 Lebensmonaten** BDV-infizierte Altersgruppe wies als einzige Untersuchungsgruppe eine astrogliale Aktivierung in vier von fünf Tieren in Folge der BDV-Infektion auf (siehe Abb. 4.2.1.1.f). Diese Tiere zeigten im Vergleich zu den scheininfizierten Kontrolltieren sowohl eine höhere Dichte markierter Astrozyten im Bereich des Corpus callosum, der septalen Kerngebiete und des frontalen Kortex (siehe Abb. 4.2.1.1.f). Neben morphologisch unauffälligen Astrozyten fanden sich besonders im Hippokampus der BDV-infizierten Tiere dieser Altersgruppe Astrozyten mit großen Somata und erhöhter GFAP-Expression.

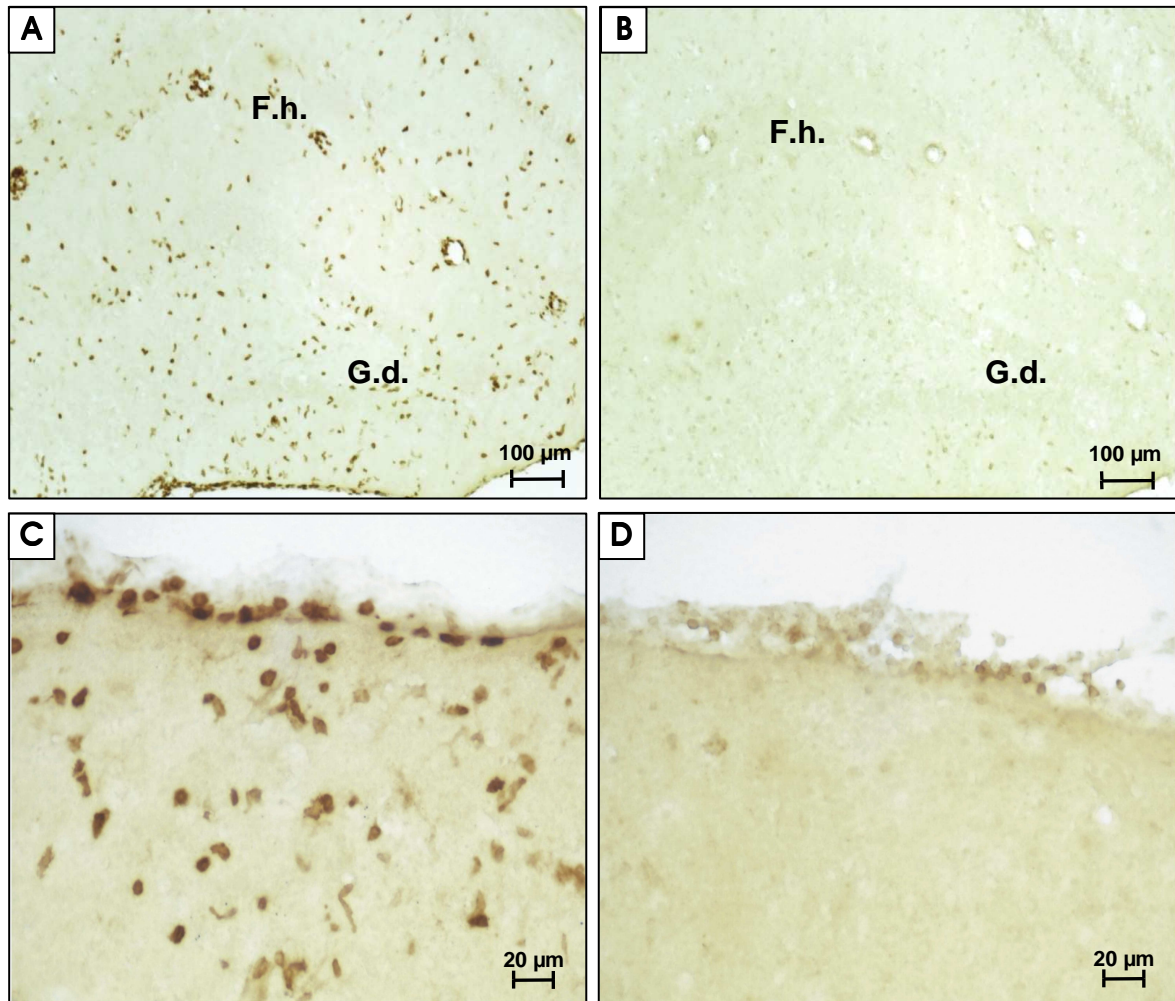


Abb. 4.2.1.1.e: Vergleich der Dichte von CD₄-T-Zellen und CD₈-T-Zellen am Beispiel eines BDV-infizierten Tieres der Altersgruppe 13,5 Monate

Hochgradige parenchymale und vaskuläre CD₄-T-Zellinfiltrationen im Hippokampus (A) und im somatomotorischen Kortex im Bereich der Meningen (C). Deutlich weniger und schwächer angefärbte CD₈-T-Zellen in den jeweils korrespondierenden Hirnregionen (B und D) desselben BDV-infizierten Tieres.

F.h. = Fissura hippocampi

G.d. = Gyrus dentatus

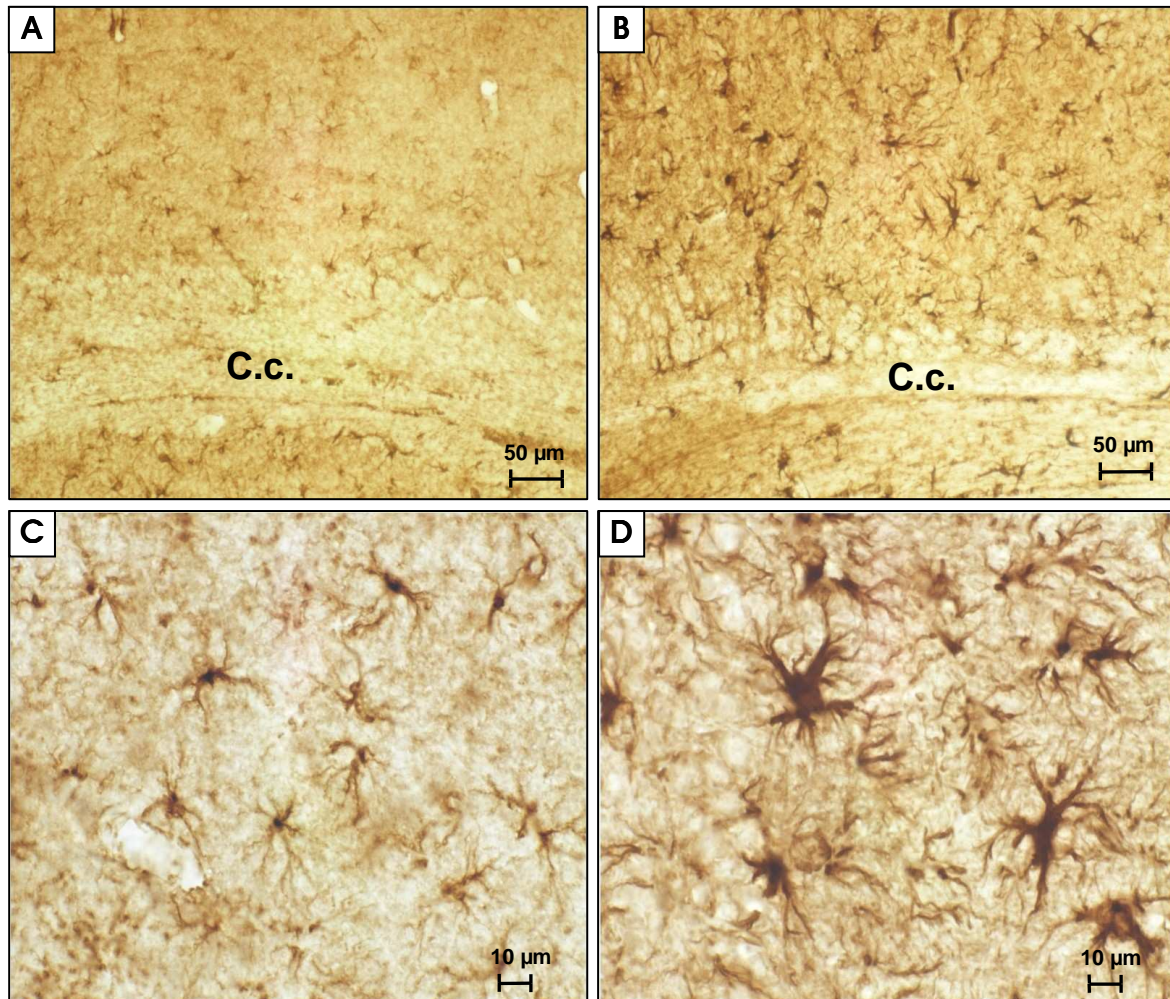


Abb. 4.2.1.1.f: Nachweis von Astroglia mittels polyklonalem GFAP-Antikörper; Vergleich Kontrolltier und BDV-Tier der Altersgruppe 11 Monate

BDV-infizierte Tiere (B) wiesen mehr und deutlicher markierte Astrozyten auf als nicht infizierte Kontrolltiere (A); exemplarisch dargestellt aus dem Bereich des Corpus callosum (C.c.). Auch morphologisch lag eine astrogliale Aktivierung bei diesen BDV-Tieren vor, die sich durch dicke Astrozyten-Somata mit kurzen, plumpen Fortsätzen auszeichnete (D). Astrozyten der Kontrolltiere hingegen wiesen schmale Zellkörper mit langen, schlanken Fortsätzen auf (C).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Astroglia-Detektion der beiden anderen Altersgruppen (**13,5 Monate und 18 Monate**) zeigten keine astrogliale Aktivierung nach der BDV-Infektion (siehe Abb. 4.2.1.1.g). Ebenso wie in den Vorversuchen waren in beiden Altersgruppen zwar ubiquitär Astrozyten markiert, jedoch waren weder in Anzahl, Morphologie noch Färbeintensität Unterschiede zwischen den BDV-infizierten Tieren und den scheininfizierten Kontrolltieren zu verzeichnen. BDV-infizierte Tiere und Kontrolltiere der Altersgruppen 13,5 und 18 Monate entsprachen dem immunhistochemischen Bild der Kontrolltiere aus der Altersgruppe 11 Monate.

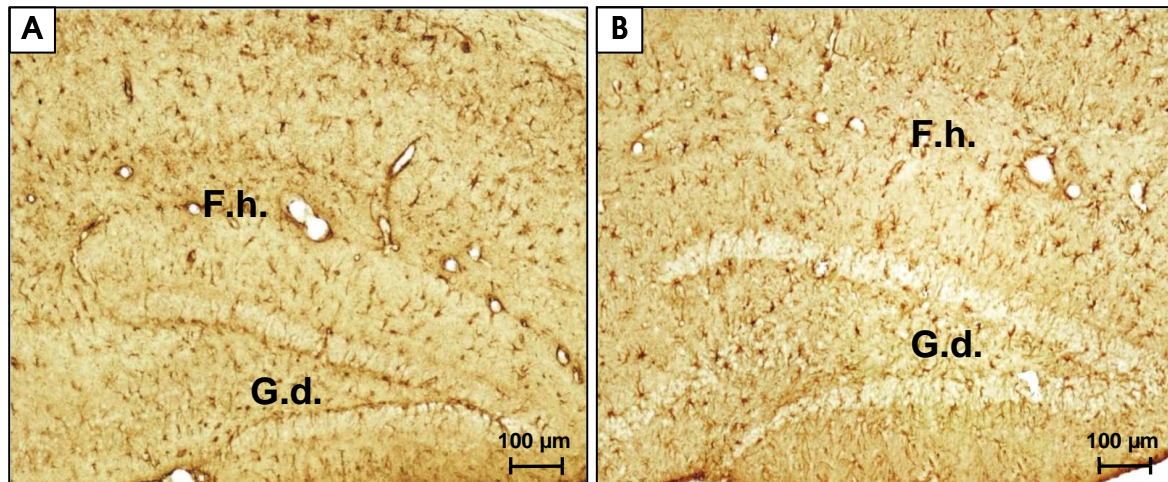


Abb. 4.2.1.1.g: Nachweis von Astroglia mittels GFAP-Antiserum; Vergleich Kontrolltiere und BDV-Tiere der Altersgruppe 13,5 Monate am Beispiel der Hippokampus-Region

Keine Unterschiede bezüglich Anzahl, Morphologie und Markierungsintensität der Astrozyten zwischen BDV-infizierten Tieren (A) und scheininfizierten Kontrolltieren (B).

F.h. = Fissura hippocampi

G.d. = Gyrus dentatus

Bei den scheininfizierten Kontrolltieren aller drei Altersgruppen wurden in allen untersuchten Hirnregionen vorwiegend ruhende **Mikrogliazellen** mit dem spezifischen **Antikörper F4/80** nachgewiesen. Typische Merkmale waren schwache Färbeintensität, schmale Somata mit langen, schlanken Fortsätzen, die sich als blass-fibrilläres Netzwerk darstellten. Es traten keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren der Altersgruppen 11 und 13,5 Monate auf. Lediglich in der Altersgruppe 18 Monate wiesen zwei von drei transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren neben den vorherrschenden ruhenden Mikrogliazellen sehr vereinzelt auch plumpere, kräftiger markierte Mikrogliazellen auf, während sich in Kontrolltieren vom Wildtyp, wie in den anderen Altersgruppen, ausschließlich ruhende Mikrogliazellen fanden.

Die BDV-infizierten Tiere aller drei Altersgruppen wiesen deutlich aktivierte Mikrogliazellen mit einheitlichem Verteilungsmuster auf. Die BDV-infizierten Tiere zeigten plumpe, abgerundete, kräftig braun markierte aktivierte Mikrogliazellen mit kurzen, dicken, buschig verzweigten Fortsätzen. Teilweise waren die Zellfortsätze so stark verkürzt, dass die Zellen mit ihren spheroiden Somata amöboide Gestalt annahmen (siehe Abb. 4.2.1.1.h).

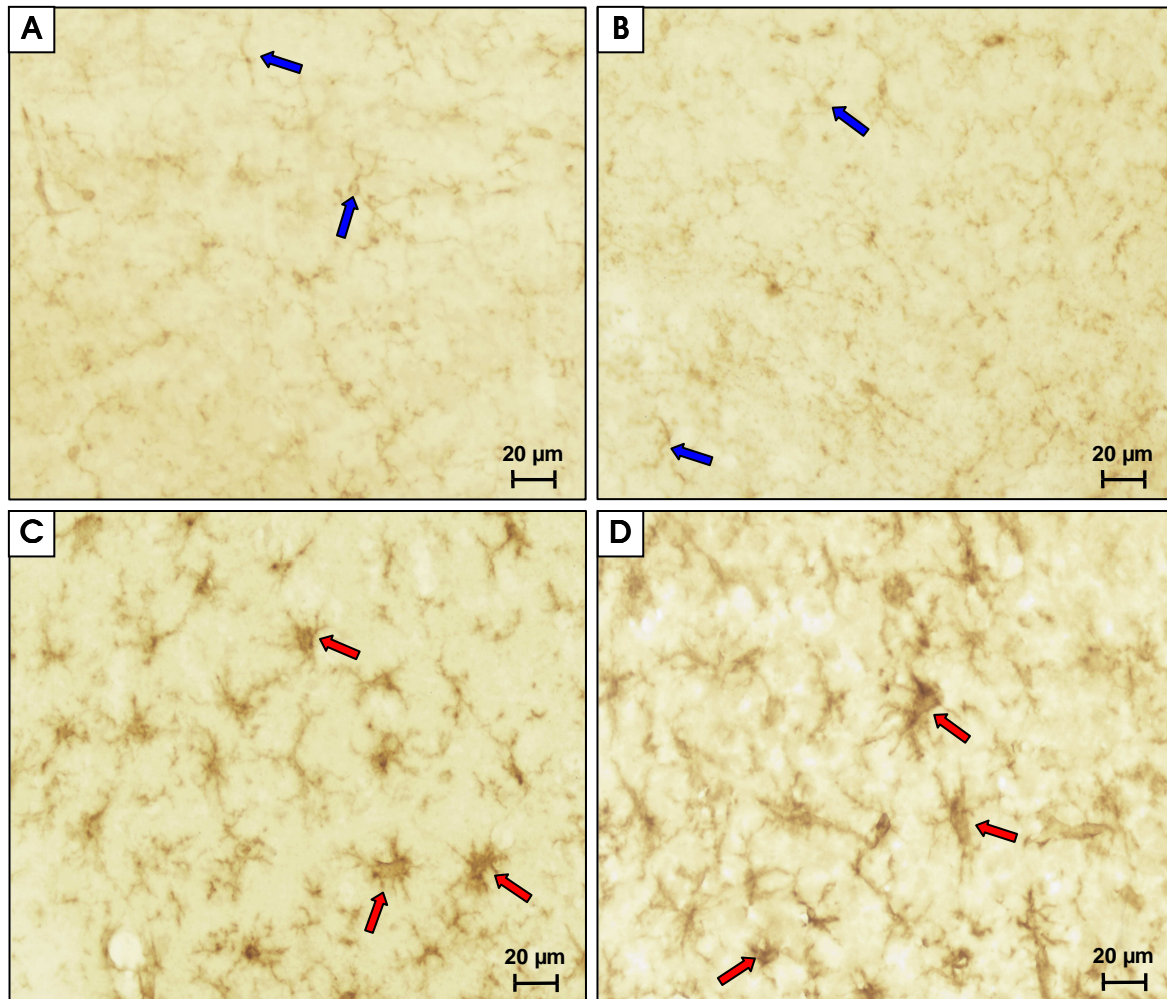


Abb. 4.2.1.1.h: Nachweis von Mikroglia mittels Antikörper F4/80; Vergleich von ruhender und aktivierter Mikroglia in hAPP-transgenen Mäusen und in Wildtyp-Mäusen am Beispiel der Altersgruppe 13,5 Monate

Kontrolltiere (A, B): Mikrogliazellen von scheininfizierten Wildtyp-Mäusen (A) und scheininfizierten, transgenen Mäusen (B) unterschieden sich morphologisch nicht. Typische mikrogliale Ruheform mit langgestreckten, schlanken und blassen Zellkörpern sowie langen, dünnen Fortsätzen (blaue Pfeile).

BDV-Tiere (C, D): Mikrogliazellen von BDV-infizierten Wildtyp-Mäusen (C) und BDV-infizierten, transgenen Mäusen (D) zeigten charakteristische aktivierte Gliazellmorphologie unabhängig vom Genotyp: Kräftig markierte Zellen mit dickem, zum Teil amöboidem Zellkörper (rote Pfeile) und kurzen, plumpen Fortsätzen.

Es lag in allen drei Altersgruppen ein relativ einheitliches Mikroglia-Markierungsmuster der BDV-infizierten Tiere vor. Allerdings war der Grad der Mikroglia-Aktivierung nach BDV-Infektion bei vier von sechs Tieren der Altersgruppe 18 Monate geringer als bei den BDV-infizierten Tieren der Altersgruppen 11 und 13,5 Monate. Bei diesen vier Tieren lag die Anzahl der hypertrophierten und deutlich markierten Mikrogliazellen deutlich niedriger.

Nur in den Hirnregionen der BDV-infizierten Tiere, in denen lymphozytäre Infiltrationen vorlagen – vor allem im Bereich des Hippokampus, des visuellen und motorischen, sowie des ektorhinalen Kortex – kam es auch zu der oben beschriebenen Mikroglia-Aktivierung (siehe Abb. 4.2.1.1.j). In den Hirnarealen der BDV-infizierten Tiere hingegen, in denen keine Lymphozyteninfiltrate zu finden waren, waren überwiegend ruhende Mikrogliazellen vorhanden. Dieser Befund ließ sich auch durch semiquantitative Analyse und durch die statistische Korrelations-Prüfung nach SPEARMAN-RHO bestätigen.

Altersgruppe	Parameter	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt	Bregma-Ebene -2,8 mm gesamt
11 Monate (n = 9)	Korrelations- koeffizient	0,927	0,952	0,853
	p-Wert	0,000	0,000	0,003
13,5 Monate (n = 10)	Korrelations- koeffizient	0,664	0,878	0,862
	p-Wert	0,036	0,001	0,001
18 Monate (n = 9)	Korrelations- koeffizient	0,857	0,739	/
	p-Wert	0,003	0,023	/

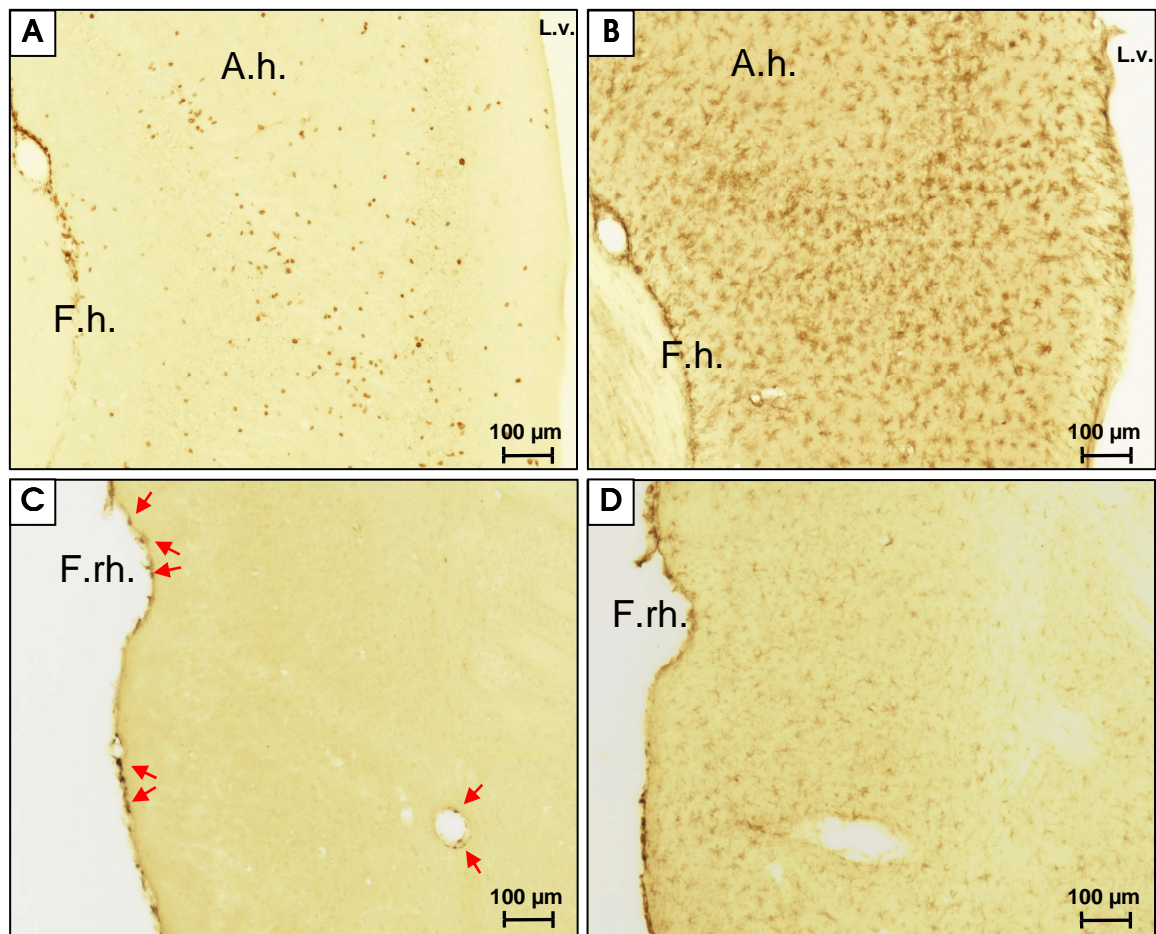


Abb. 4.2.1.1.j: Darstellung von CD₄-T-Lymphozyten und Mikroglia-Aktivierung an Folgeschnitten von BDV-infizierten Mäusen der Altersgruppe 13,5 Monate

A und C: CD₄-T-Zell-Nachweis B und D: Mikroglia-Nachweis

BDV-infiziertes Tier mit zahlreichen markierten CD₄-Zellen in der CA3-Region des Hippokampus (**A**) zeigte in der entsprechenden Region auch zahlreiche aktivierte Mikrogliazellen (**B**). BDV-infiziertes Tier mit nur vereinzelten markierten, meningealen und perivaskulären CD₄-Zellen (Pfeile) im Bereich des ektorhinalen Kortex (**C**) zeigte überwiegend ruhende Mikrogliazellen in der entsprechenden Region (**D**).

F.rh. = Fissura rhinalis F.h. = Fissura hippocampi A.h. = Ammonshorn L.v. = Lateralventrikel

Bei der Zusammenfassung der untersuchten Areale der jeweiligen Koronal-Ebene (Bregma-Region) erbrachte die Korrelationsprüfung der graduell erfassten Parameter Lymphozyten-infiltration und Mikroglia-Aktivierung (zur Auswertung siehe Klassifizierungsschema in Tiere, Material und Methoden 3.3.4, S. 36/37 sowie Anhang III, S. XX) einen statistisch signifikanten Zusammenhang in allen untersuchten Regionen der drei Altersgruppen (siehe Tab. 4.2.1.1.i).

4.2.1.2 Nachweis und quantitative Analyse von β -Amyloid-Ablagerungen

Der Nachweis der β -Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen der hAPP-transgenen Mäuse aller drei Altersgruppen – 11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate – erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper Anti-beta-Amyloid₁₋₄₂, der die aus 42 Aminosäuren bestehende Form des β -Amyloid-Peptids erkennt. Bei keinem der Wildtyp-Kontrolltiere wurde β -Amyloid-Material in den Gehirnen nachgewiesen.

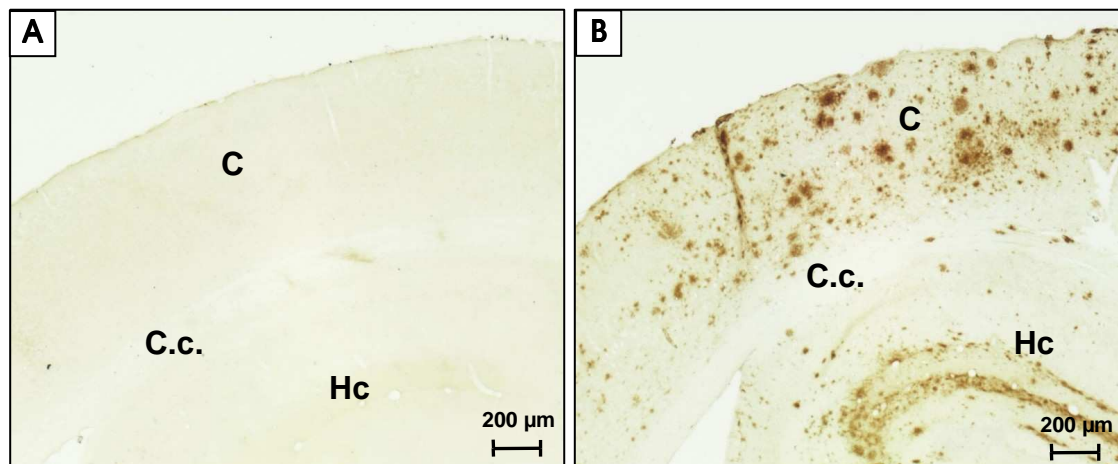


Abb. 4.2.1.2.a: Vergleich der Amyloid-Ablagerungen vom Wildtyp-Tier und hAPP-transgenem Tier der Altersgruppe 18 Monate

Scheininfizierte Wildtyp-Kontrollmaus ohne β A₁₋₄₂-Ablagerungen im Kortex und im Hippokampus (A). Gleichaltrige scheininfizierte, transgene Kontrollmaus mit zahlreichen, zum Teil konfluierenden β A₁₋₄₂-Ablagerungen im Kortex (C) und im Hippokampus (Hc) (B). C.c. = Corpus callosum

Alle untersuchten transgenen Mäuse – sowohl die BDV-infizierten Tiere als auch die nicht infizierten Kontrolltiere – wiesen bestimmte Prädispositionsstellen in den Gehirnen auf, an denen die Amyloid-Ablagerungen vorrangig zu finden waren: Im Bereich der gesamten Hippokampusformation, im zingulären Kortex, im entorhinalen und perirhinalen Kortex sowie teilweise auch in den Faserstrukturen des Corpus callosum. Dieses Verteilungsmuster war in allen Altersgruppen zu finden.

Die quantitative Erfassung des immunhistochemischen β -Amyloid₁₋₄₂-Nachweises mit Hilfe von computergestützter, histometrischer Flächenanalyse zeigte mit fortschreitendem Alter eine Zunahme der Amyloid-Belastung in den Gehirnen der hAPP-transgenen Mäuse.

Da sich die Plaque-Formation der **Altersgruppe 11 Lebensmonate** noch im Anfangsstadium befand, waren hier nur sehr vereinzelte β -Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen nachweisbar (siehe Abb. 4.2.1.2.f). Allerdings zeigte die computergestützte quantitative Analyse bereits in diesem frühen Stadium der Amyloid-Peptid-Akkumulation eine tendenziell verringerte Plaque-Anzahl in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere im Vergleich zu den scheininfizierten

Kontrolltieren, die im Areal 1 der Koronalebene Bregma 0,26 mm statistisch signifikant war (siehe Abb. 4.2.1.2.b).

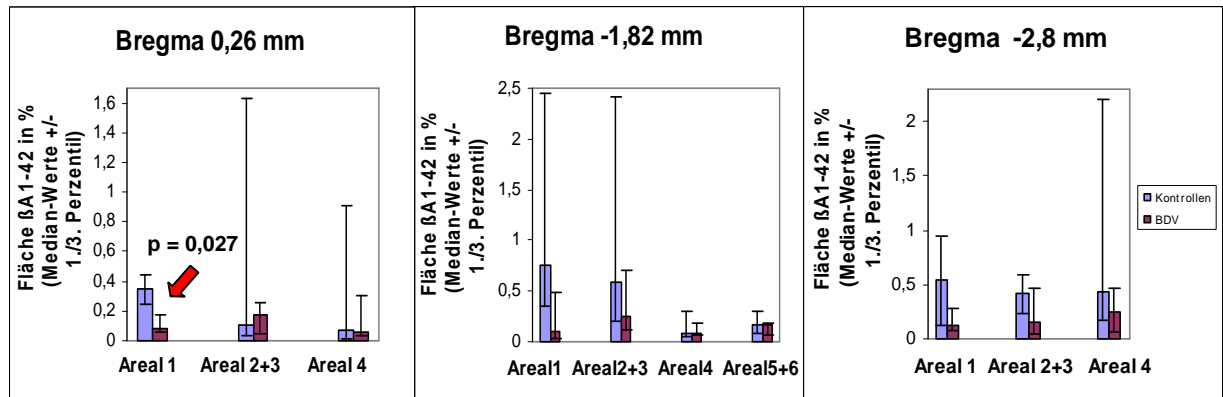


Abb. 4.2.1.2.b: β -Amyloid₁₋₄₂-Gehalt in drei untersuchten Hirnebenen von Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate

Dargestellt sind die Median-Werte \pm 1/3. Perzentil von vier scheininfizierten Kontrollmäusen und fünf BDV-infizierten Mäusen; $p < 0,05$

In der **Altersgruppe 13,5 Monate** waren bereits massive und quantitativ hochgradige β -Amyloid-Ablagerungen an den typischen Lokalisationen in den Gehirnen der transgenen BDV- und Kontrolltiere zu finden. Die bereits mikroskopisch augenscheinliche Reduktion der Amyloid-Belastung in den Gehirnen der transgenen, BDV-infizierten Tiere im Vergleich zu den transgenen, scheininfizierten Tieren (siehe Abb. 4.2.1.2.d) konnte durch die histometrische Flächenanalyse verifiziert werden (siehe Abb. 4.2.1.2.c).

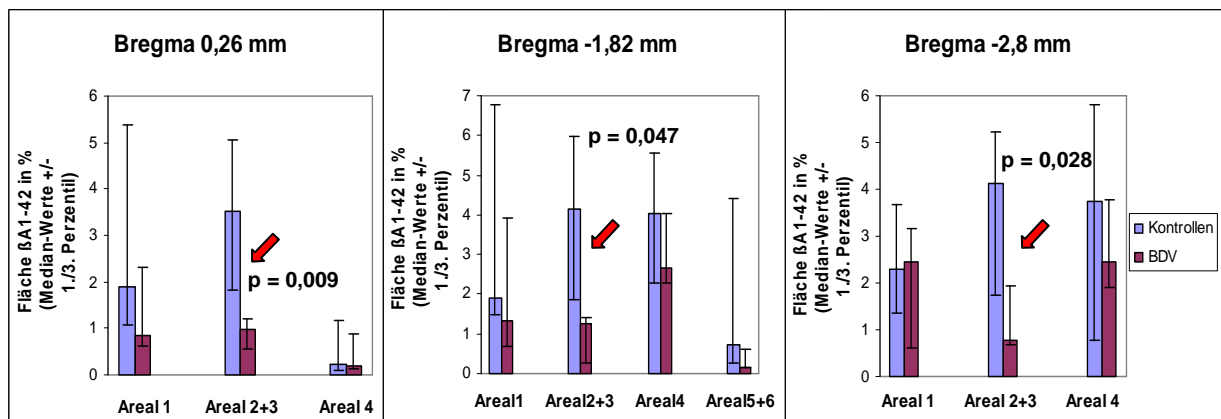


Abb. 4.2.1.2.c: β -Amyloid₁₋₄₂-Gehalt in drei untersuchten Hirnebenen von Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 13,5 Monate

Dargestellt sind die Median-Werte \pm 1/3. Perzentil von fünf scheininfizierten Kontrollmäusen und fünf BDV-infizierten Mäusen; $p < 0,05$

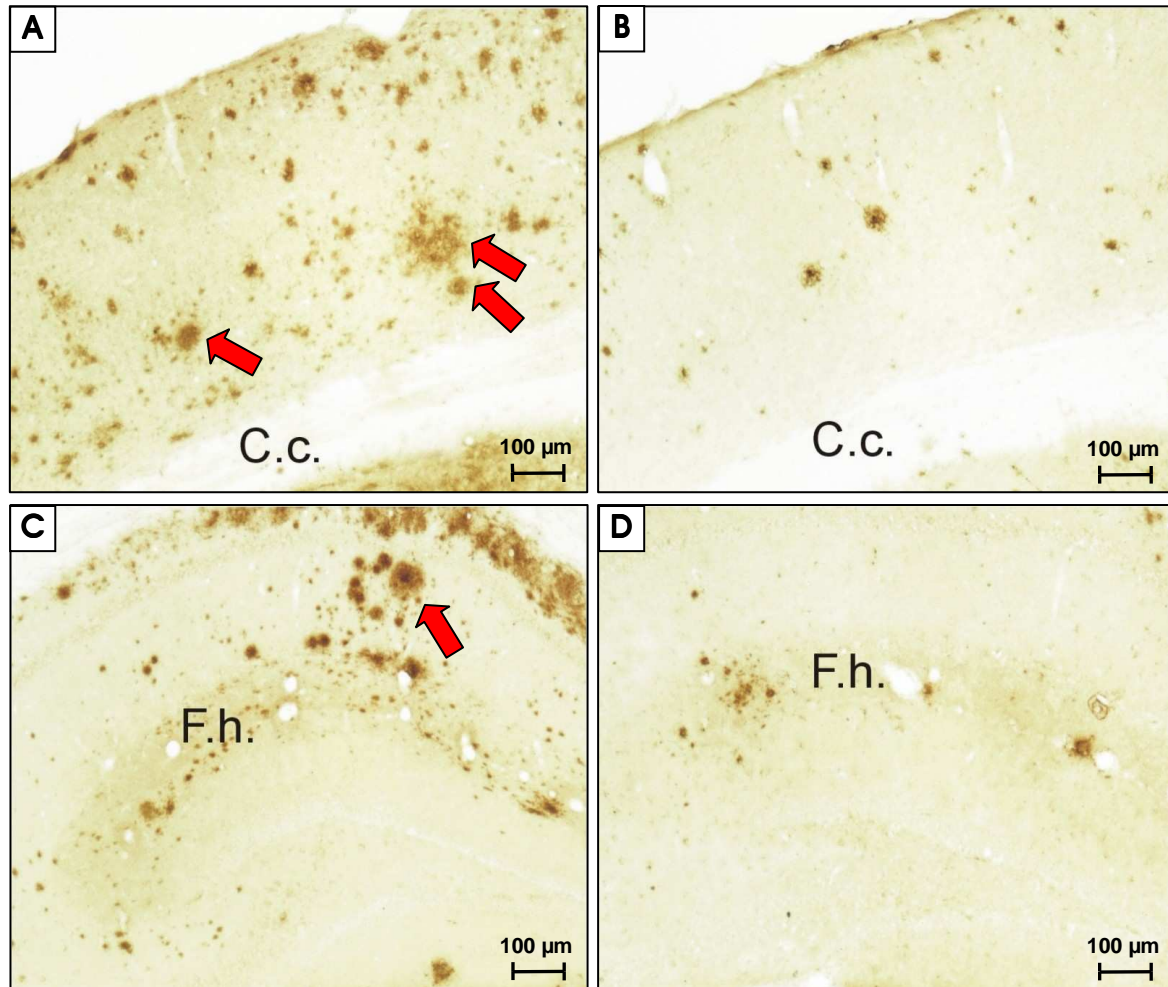


Abb. 4.2.1.2.d: Vergleich der β -Amyloid₁₋₄₂-Belastung in verschiedenen Hirnregionen von repräsentativen, transgenen, BDV-infizierten Tieren (B und D) und transgenen Kontrolltieren (A und C) der Altersgruppe 13,5 Monate

Scheininfiziertes Kontrolltier mit zahlreichen großen, konfluierenden β A-Ablagerungen (rote Pfeile) im somatosensorischen Kortex (A). BDV-infiziertes Tier mit kleineren und nur vereinzelten β A-Ablagerungen in der entsprechenden Region (B). Scheininfiziertes Kontrolltier mit hochgradiger β A-Markierung v. a. im hippocampalen Areal CA1 und im Stratum oriens (roter Pfeil) (C). BDV-infiziertes Tier mit nur sehr wenig β A-Markierung in der entsprechenden Region (D). C.c. = Corpus callosum F.h. = Fissura hippocampi

In der **Altersgruppe 18 Monate** wurden in den Gehirnen aller untersuchten transgenen Tiere (BDV- und scheininfiziert) massive β -Amyloid₁₋₄₂-Ablagerungen detektiert (siehe Abb. 4.2.1.2.a und 4.2.1.2.f). In sieben von zehn untersuchten Arealen wurde auch in dieser Altersgruppe tendenziell weniger β -Amyloid-Belastung in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere gefunden, als in den Gehirnen der scheininfizierten Kontrolltiere. Allerdings wurde der Befund in dieser Altersgruppe durch die computergestützte histometrische, quantitative Flächenanalyse nicht verifiziert, da die Unterschiede in der β -Amyloid-Belastung zwischen BDV- und scheininfizierten Tieren nicht signifikant waren (siehe Abb. 4.2.1.2.e).

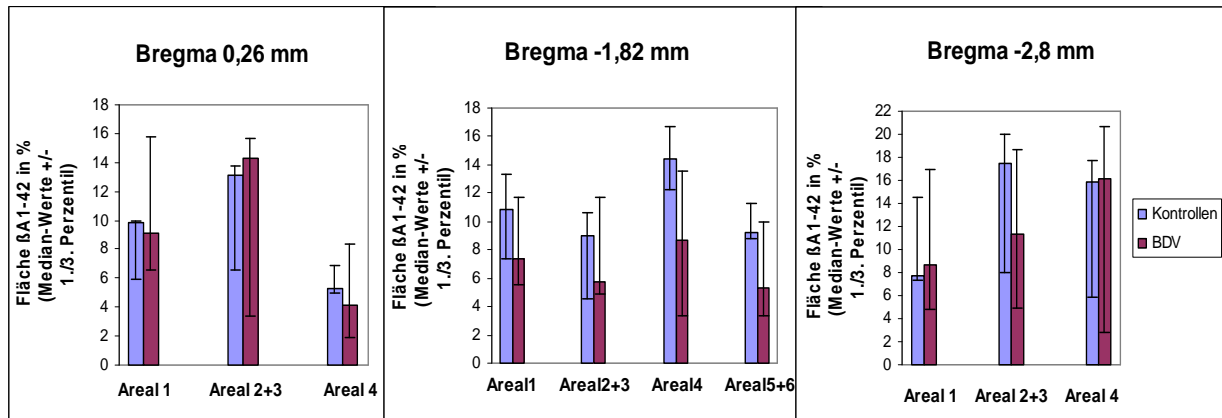


Abb. 4.2.1.2.e: β -Amyloid₁₋₄₂-Gehalt in untersuchten Hirnebenen von Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 18 Monate

Dargestellt sind die Median-Werte \pm 1./3. Perzentil von drei scheininfizierten Kontrollmäusen und sechs BDV-infizierten Mäusen; $p < 0,05$

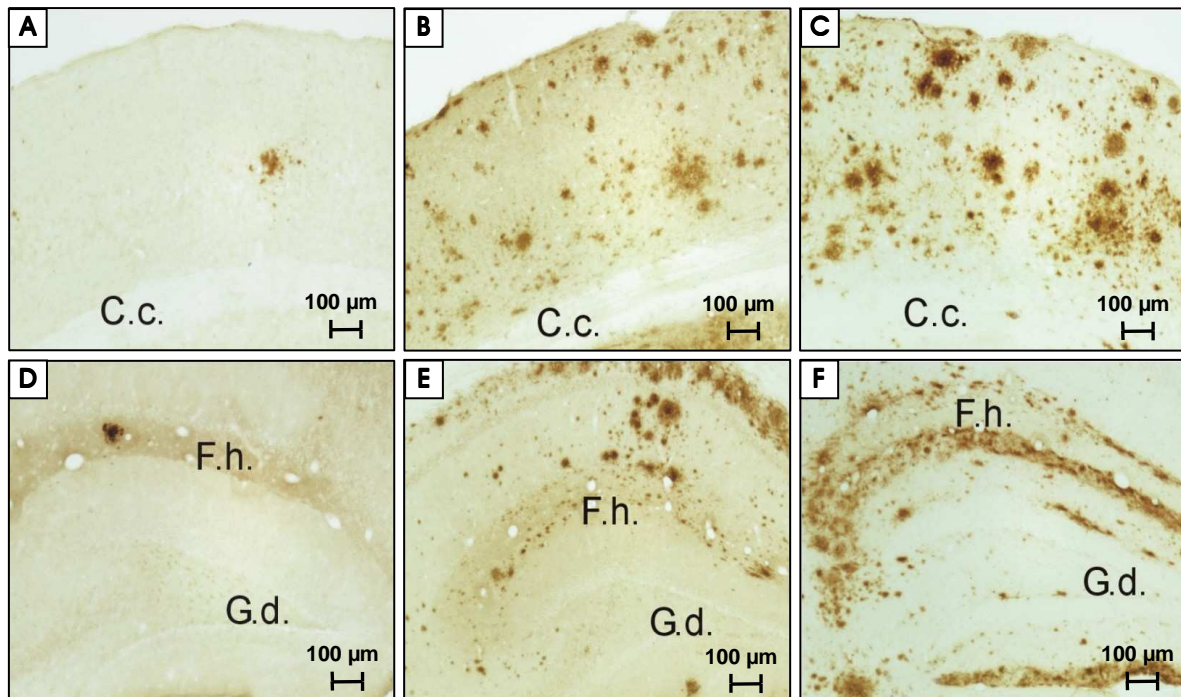


Abb. 4.2.1.2.f: Vergleich der β A₁₋₄₂-Belastung von repräsentativen, transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren der drei untersuchten Altersgruppen im somatosensorischen Kortex (A, B, C) sowie im Hippokampus (D, E, F)

11 Monate (A, D): Nur vereinzelt akkumuliertes β A₁₋₄₂ in Kortex (A) und Hippokampus (D).

13,5 Monate (B, E): Deutlich mehr β A₁₋₄₂ in diesen Regionen. **18 Monate (C, F):** Massive β A₁₋₄₂-Akkumulationen sowohl im Kortex (C) als auch im Hippokampus (F).

C.c. = Corpus callosum

F.h. = Fissura hippocampi

G.d. = Gyrus dentatus

Zusammenfassend zeigte sich vier Wochen nach der BDV- bzw. Scheininfektion in allen drei untersuchten Altersgruppen bei den BDV-infizierten Tieren eine tendenziell geringere β -Amyloid-Belastung als in den entsprechenden Hirnregionen der scheininfizierten Kontrolltiere. In der Altersgruppe 13,5 Monate waren die deutlichsten Differenzen messbar.

Die Zusammenfassung der einzeln ausgewerteten Hirnareale zu den jeweiligen Gesamt-Koronalebenen (Gesamt-Bregma-Ebenen) veranschaulicht diese Tendenz in allen drei Altersgruppen; des Weiteren wird auch die mit zunehmendem Alter ansteigende β -Amyloid₁₋₄₂-Belastung in den Gehirnen der Kontroll- und BDV-Mäuse offensichtlich (siehe Abb. 4.2.1.2.g).

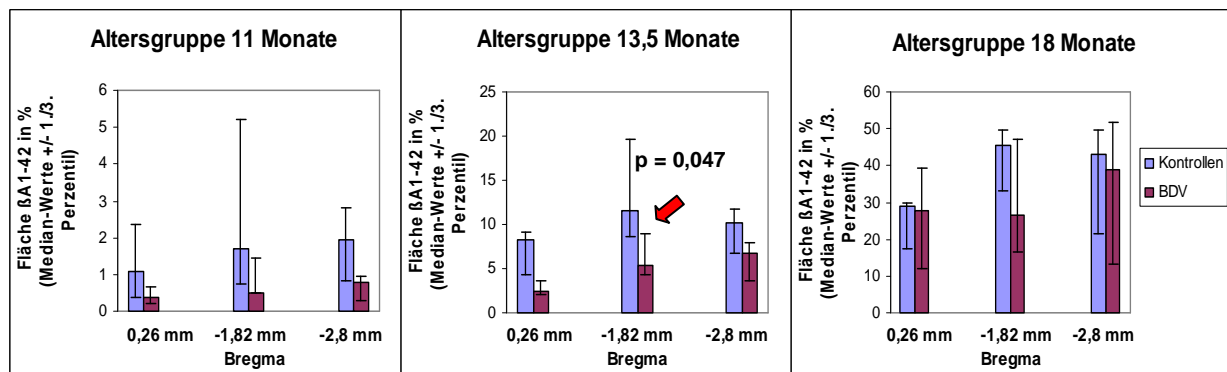


Abb. 4.2.1.2.g: Vergleich des β -Amyloid₁₋₄₂-Gehaltes zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Gesamt-Koronalebenen aller drei Altersgruppen

In allen drei Altersgruppen wurde in jeder ausgewerteten Koronalebene bei den BDV-infizierten Tieren tendenziell weniger β A₁₋₄₂-Material registriert, als in den entsprechenden Koronalebenen der Kontrolltiere. Signifikante Unterschiede sind mit rotem Pfeil gekennzeichnet. Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1./3. Perzentil der untersuchten scheininfizierten Kontrolltiere und der BDV-infizierten Tiere; $p < 0,05$

4.2.2 Korrelationsprüfung zwischen β -Amyloid₁₋₄₂-Reduktion und Mikroglia-Aktivierung

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Mikroglia-Aktivierung und der β -Amyloid-Reduktion vorliegt, wurden lokale Korrelationsprüfungen nach SPEARMAN-RHO durchgeführt. Es wurde biostatistisch untersucht, ob in den Hirnarealen der BDV-infizierten Tiere, in denen eine hochgradige Mikroglia-Aktivierung vorlag, auch eine besonders deutliche Reduktion der β -Amyloid-Belastung zu verzeichnen war bzw. ob in den Hirnarealen der BDV-infizierten Tiere, in denen nur eine vergleichsweise geringe oder keine β -Amyloid-Reduktion registriert wurde, keine oder nur eine geringgradige Mikroglia-Aktivierung vorlag.

Dazu wurden jeweils die entsprechenden Hirnareale aller BDV-infizierten Tiere innerhalb der drei Altersgruppen miteinander verglichen und auf lokale Korrelationen zwischen **Mikroglia-Aktivierungsgrad** (siehe Klassifizierungsschema in Tiere, Material und Methoden 3.3.4.3 auf S. 37) und **β -Amyloid-Reduktionsgrad** geprüft. Zur Ermittlung des β -Amyloid-Reduktionsgrades wurde für jedes untersuchte Areal der β -Amyloid-Flächen-Median der nicht infizierten Kontrolltiere zu den β -Amyloid-Flächen-Werten jedes einzelnen BDV-infizierten Tieres dieses Areals in Beziehung gesetzt; keine Reduktion entsprach dem Median-Wert der Kontrolltiere. Anschließend erfolgte eine Klassifizierung der β A-Reduktion, die abhängig von der Werteverteilung vorgenommen wurde, wie folgt:

- 0 = Keine β A-Reduktion bzw. Erhöhung bei den BDV-infizierten Tieren in diesem Areal.
 1 = Geringgradige β A-Reduktion (Reduktion um 1 % bis 34,9 % des Medians der Kontrolltiere).
 2 = Mittelgradige β A-Reduktion (Reduktion um 35 % bis 79,9 % des Medians der Kontrolltiere).
 3 = Hochgradige β A-Reduktion (Reduktion um 80 % bis 100 % des Medians der Kontrolltiere).

Es konnten jedoch in keinem Fall signifikante Korrelationen dieser beiden Parameter gefunden werden (siehe Tabelle 4.2.2.a). Das bedeutet, dass der Grad der mikroglialen Aktivierung auf der Ebene der einzelnen untersuchten Areale nicht in Beziehung zum Reduktionsgrad der β -Amyloid-Belastung in den Gehirnen der BDV-infizierten, hAPP-transgenen Mäuse steht.

Tab. 4.2.2.a: Korrelationsprüfung zwischen der β A₁₋₄₂-Abnahme und der lokalen mikroglialen Aktivierung bei den BDV-infizierten Mäusen aller drei Altersgruppen

Der nichtparametrische Korrelations-Test nach SPEARMAN-RHO zeigt, dass der Grad der β -Amyloid-Reduktion nach BDV-Infektion in keinem der untersuchten Areale mit dem Grad der mikroglialen Aktivierung korrelierte; $p < 0,05$; / : Nicht auswertbar.

Altersgruppe	Parameter	Bregma-Ebene 0,26 mm			Bregma-Ebene -1,82 mm				Bregma-Ebene -2,8 mm		
		Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
11 Monate (n = 5)	Korrelations- koeffizient	0,19	/	/	0,00	-0,35	-0,58	0,65	/	0,00	0,32
	p-Wert	0,76	/	/	1,00	0,56	0,42	0,24	/	1,00	0,68
13,5 Monate (n = 5)	Korrelations- koeffizient	0,13	0,56	-0,81	-0,18	-0,30	-0,35	-0,23	0,32	-0,76	0,06
	p-Wert	0,84	0,33	0,10	0,78	0,62	0,56	0,71	0,60	0,14	0,93
18 Monate (n = 6)	Korrelations- koeffizient	-0,02	-0,11	-0,35	0,08	0,67	-0,65	0,39	-0,48	-0,43	-0,56
	p-Wert	0,97	0,83	0,50	0,97	0,15	0,24	0,44	0,34	0,39	0,38

4.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Zusätzlich zu den oben beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen mittels β -Amyloid₁₋₄₂-Antikörper wurden die β -Amyloid-Ablagerungen in dieser Arbeit unter Verwendung des Flavoproteins Thioflavin-S dargestellt und quantifiziert.

4.2.3.1 Nachweis und quantitative Analyse der Amyloid-Ablagerungen mittels Thioflavin-S-Färbung

Es wurden Hirnschnitte von transgenen, BDV-infizierten Tieren und von transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren von allen drei Altersgruppen mit Thioflavin-S gefärbt. Als Negativ-

kontrollen wurden in jeder Altersgruppe Hirnschnitte von jeweils zwei bis drei Mäusen vom Wildtyp, die keine Amyloid-Ablagerungen in ihren Gehirnen ausbilden, ebenfalls mit Thioflavin-S gefärbt. Bei diesen Wildtyp-Tieren wurden keine fluoreszierenden Signale festgestellt, die morphologisch und nach dem Grad der Markierungsintensität Amyloid-Ablagerungen entsprachen. Allerdings wurden bei diesen Tieren häufig vaskuläre, schwach positive Strukturen durch das Thioflavin-S markiert (siehe Abb. 4.2.3.1.a.A und C). Jedoch stellten sich bei den vaskulären Strukturen der Wildtyp-Tiere durch das Thioflavin-S lediglich Umrissse der Gefäßwände ganz schwach fluoreszierend dar, sodass diese blass fluoreszierenden Strukturen sich morphologisch deutlich von den geldrollenartigen, stark grünlich fluoreszierenden, vaskulären, Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Signalen unterscheiden ließen, die insbesondere bei den BDV-infizierten, transgenen Tieren aller drei Altersgruppen zu finden waren (siehe Abb. 4.2.3.1.a.B und D).

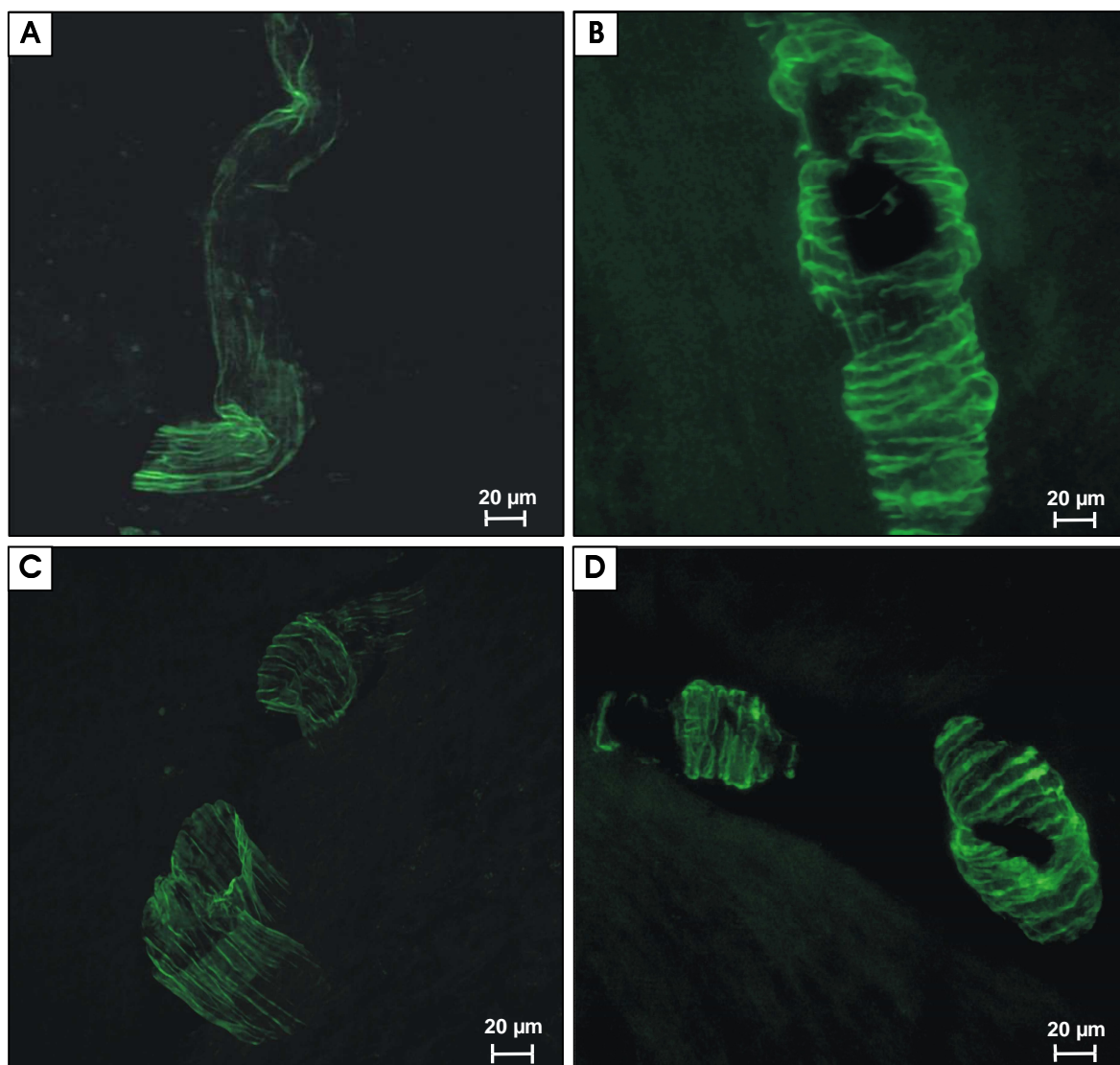


Abb. 4.2.3.1.a: Thioflavin-S-Fluoreszenz in einem scheininfizierten Wildtyp-Tier (A, C) und einem BDV-infizierten, transgenen Tier (B, D) der Altersgruppe 13,5 Monate

Blass markierte Endothelzellgrenzen in Gefäßen im somatosensorischen Kortex eines scheininfizierten Wildtyp-Kontrolltieres ohne Plaque-Ausbildung, die durch das Thioflavin-S schwach markiert werden (A, C). BDV-infiziertes, transgenes Tier mit deutlich markiertem Thioflavin-S-positivem, vaskulärem β -Amyloid-Material (B, D) im somatosensorischen Kortex.

Zur Quantifizierung der Amyloid-Ablagerungen wurden die fluoreszierenden Signale der transgenen, BDV-infizierten Tiere sowie der transgenen, nicht infizierten Tiere aller Altersgruppen pro Koronalebene (Bregma-Ebene) und pro Hirnareal (nicht gezeigt, siehe Datenmaterial in Anhang III unter 4.2.3.1.I bis 4.2.3.1.III, S. XXX bis XXXV) unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 40x gezählt. Von jedem Tier wurden drei Hirnschnitte jeweils zweifach ausgezählt, um möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen.

Sichtbar wurde auch der deutliche, altersabhängige Anstieg der β -Amyloid-Plaque-Zahl im gesamten Hirnschnitt von der Altersgruppe 11 Monate, mit relativ wenigen Thioflavin-S-positiven Plaques, bis hin zur Altersgruppe 18 Monate, mit der maximalen, von uns gemessenen Plaque-Belastung (siehe Abb. 4.2.3.1.b).

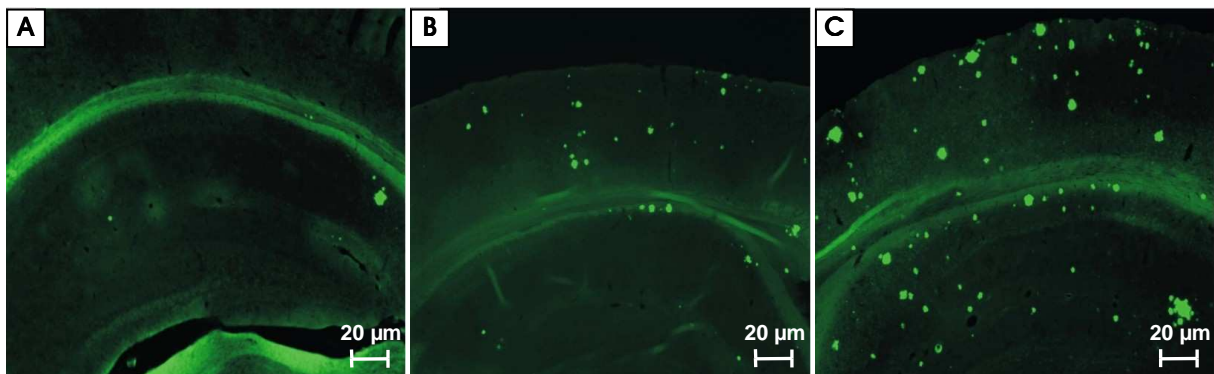


Abb. 4.2.3.1.b: Mit zunehmendem Alter ansteigender Gehalt an Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Ablagerungen im Hippokampus und im Kortex von transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren der drei untersuchten Altersgruppen

Altersgruppe 11 Monate: Nur vereinzelte Thio-S-positive β A-Ablagerungen (A).

Altersgruppe 13,5 Monate: Deutlich mehr β A-Ablagerungen vorhanden (B).

Altersgruppe 18 Monate: Zahlreiche große, kompakte, Thio-S-positive β A-Ablagerungen (C). Bei den nicht infizierten Kontrolltieren aller drei Altersgruppen fehlten perivaskuläre β A-Ablagerungen weitgehend.

In allen drei Altersgruppen (**11, 13,5 und 18 Monate**) fand sich in allen untersuchten Hirnregionen eine tendenziell geringere Anzahl parenchymatöser, Thioflavin-S-positiver β -Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere als in den entsprechenden Regionen der scheininfizierten Kontrolltiere (siehe Abb. 4.2.3.1.c).

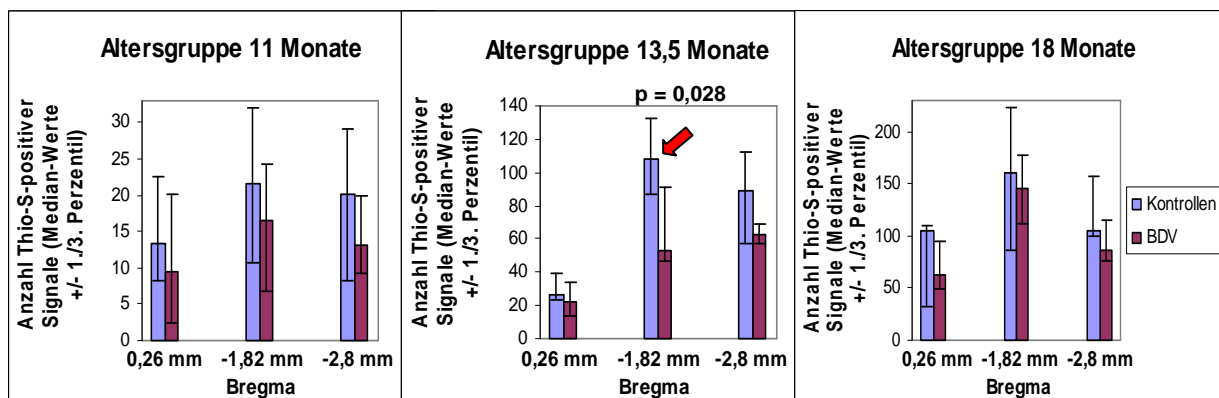


Abb. 4.2.3.1.c: Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β A-Plaque-Anzahl zwischen scheininfizierten Kontrolltieren und BDV-infizierten Tieren in den drei untersuchten Koronalebene aller drei Altersgruppen

Signifikante Reduktion der Thio-S-positiven, parenchymtösen β -Amyloid-Ablagerungen nach BDV-Infektion fand sich in der Region Bregma -1,82 mm der Altersgruppe 13,5 Monate (roter Pfeil). Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1/3. Perzentil der untersuchten scheininfizierten Kontrolltiere und der BDV-infizierten Tiere; $p < 0,05$

Diese Tendenzen waren in der Altersgruppe 13,5 Monate besonders deutlich (siehe Abb. 4.2.3.1.d). Ein signifikanter Unterschied des Thio-S-positiven, parenchymatösen Amyloid-Gehaltes zwischen BDV- und scheininfizierten Tieren wurde ausschließlich in der Bregma-Ebene -1,82 mm dieser Altersgruppe registriert (siehe Abb. 4.2.3.1.c).

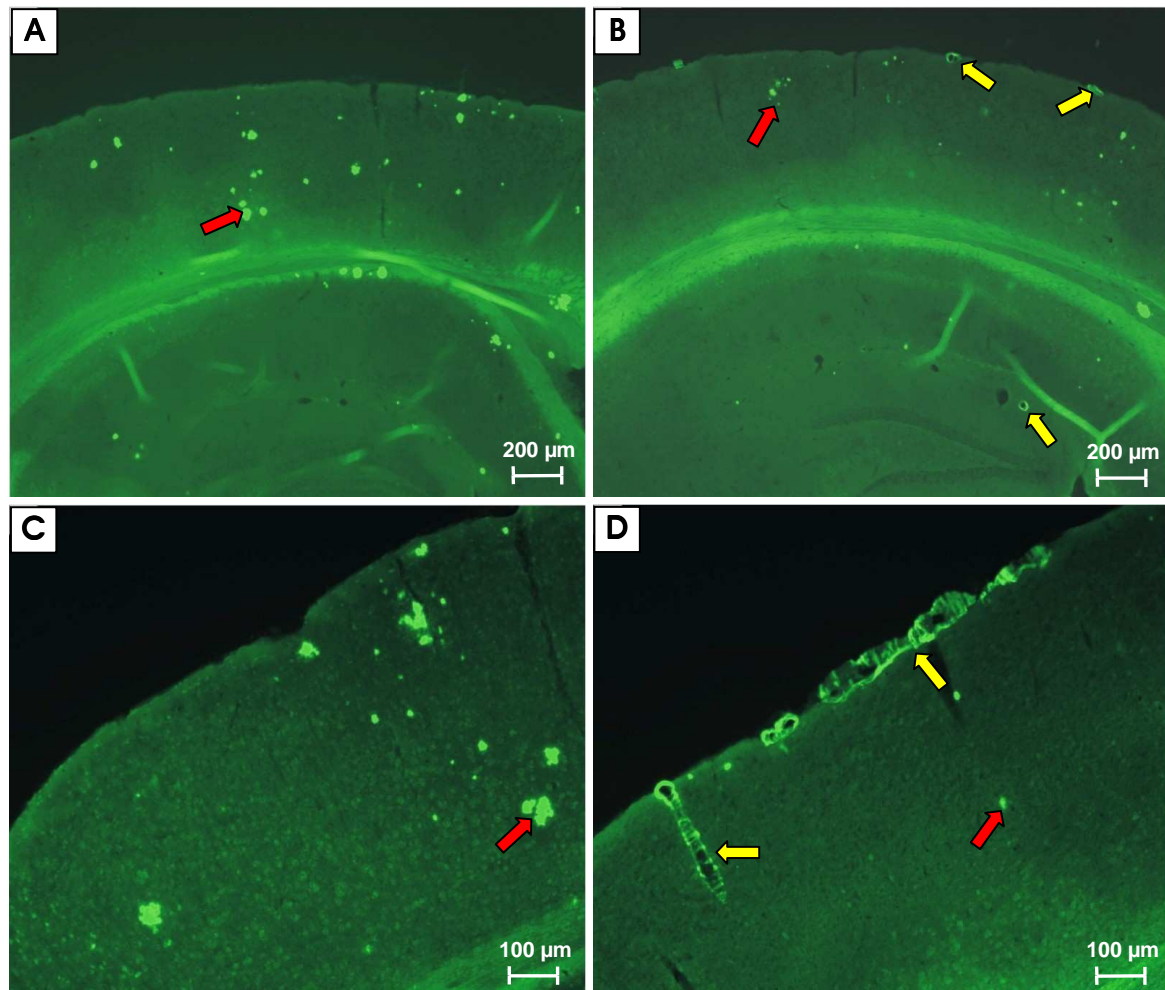


Abb. 4.2.3.1.d: Thioflavin-S-markierte β -Amyloid-Ablagerungen in hAPP-transgenen BDV- und Kontrolltieren der Altersgruppe 13,5 Monate im Hippokampus (A und B) sowie im somatosensorischen Kortex mit Pia mater (B und C)

Transgene, scheininfizierte Kontrolltiere (A und C) wiesen deutlich mehr und größere Thio-S-positive β A-Plaques (rote Pfeile) auf als transgene, BDV-infizierte Tiere (B und D) in den korrespondierenden Regionen. BDV-infizierte Tiere zeigten dagegen zahlreiche, massive, Thio-S-positive β A-Ablagerungen in den zerebralen Blutgefäßen (gelbe Pfeile in B und D), die bei den scheininfizierten Kontrolltieren weitgehend fehlten.

Die Quantifizierung des in den zerebralen Blutgefäßen lokalisierten, perivaskulären β -Amyloid-Materials zeigte, dass dieses sich quantitativ invers zum parenchymatösen Amyloid verhielt: In allen drei Altersgruppen wiesen die BDV-infizierten, transgenen Tiere tendenziell mehr Thioflavin-S-positives, perivaskuläres β -Amyloid auf als die scheininfizierten, transgenen Kontrolltiere. Auch dieser Befund war in der Altersgruppe 13,5 Monate am deutlichsten (siehe Abb. 4.2.3.1.d); hier wiesen die BDV-infizierten, transgenen Tiere in zwei von drei untersuchten Hirnregionen signifikant mehr perivaskuläres β -Amyloid auf als die scheininfizierten, transgenen Kontrolltiere (siehe Abb. 4.2.3.1.e).

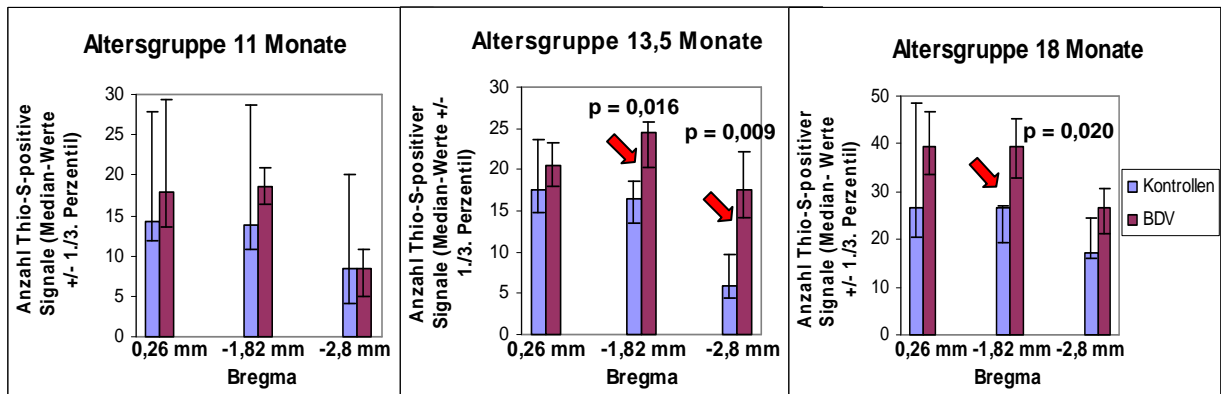


Abb. 4.2.3.1.e: Vergleich der Anzahl der Thioflavin-S-positiven, perivaskulären β A-Ablagerungen zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene aller drei Altersgruppen

In allen Altersgruppen wurden - mit einer Ausnahme - in jeder ausgewerteten Koronalebene bei den BDV-infizierten Tieren tendenziell mehr perivaskuläre β A-Ablagerungen gezählt, als in den entsprechenden Koronalebene der Kontrolltiere. Signifikante Unterschiede sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1/3. Perzentil der scheininfizierten Kontrolltiere und der BDV-infizierten Tiere; $p < 0,05$

Die Gesamterfassung der parenchymatösen und der perivaskulären, Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Signale in toto (nicht gezeigt) ergab in allen drei Altersgruppen zwar in vielen untersuchten Arealen eine tendenziell geringere Anzahl β -Amyloid-Signale in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren, allerdings waren mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede feststellbar (siehe Datenmaterial in Anhang III, S. XXVII bis XXIX). Diese Gesamterfassung verdeutlicht, dass es in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere aller drei Altersgruppen zu dem Untersuchungszeitpunkt zunächst zu einer Umverteilung des Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Materials aus dem Parenchym zu den Gefäßen und deren Umgebung kommt. Eine absolute β -Amyloid-Reduktion konnte vier Wochen p.i. lediglich in einem Hirnareal BDV-infizierter Mäuse der Altersgruppe 13,5 Monate registriert werden (siehe Tabelle und Abb. 4.2.3.1.f.B in Anhang III, S. XXVIII).

4.2.3.2 Immunfluoreszenz-Darstellung von Gliazellen in Kombination mit der Thioflavin-S-Färbung

Um zu untersuchen, ob Gliazellen und Thioflavin-S-positive Amyloid-Ablagerungen miteinander in Beziehung stehen bzw. sich gegenseitig beeinflussen, wurden Gliazellen und β -Amyloid-Plaques durch parallele Fluoreszenzmarkierung dargestellt. Diese Doppelmarkierungen wurden jedoch nur stichprobenartig an einzelnen transgenen, BDV- und scheininfizierten Tieren aus jeder Altersgruppe durchgeführt.

Mikrogliazellen stellten sich durch die vorangegangene BDV-Infektion zwar generalisiert aktiviert dar, aber es lag keine besondere Morphologie oder Häufung von direkt an Amyloid-Ablagerungen angrenzenden Mikrogliazellen vor. Mikrogliazellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft der Amyloid-Ablagerungen lokalisiert waren, unterschieden sich in ihrer Morphologie nicht von β -Amyloid-Plaques-fern lokalisierten Mikrogliazellen (siehe Abb. 4.2.3.2.a.B und C).

An einigen Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Plaques wurden potentielle Interaktionen zwischen aktivierten Mikrogliazellen und β -Amyloid-Plaques beobachtet; hier lagen die Mikrogliazellen unmittelbar an den Plaques und tangierten die Ränder der Plaques (Abb. 4.2.3.2.a C gelbe Pfeile).

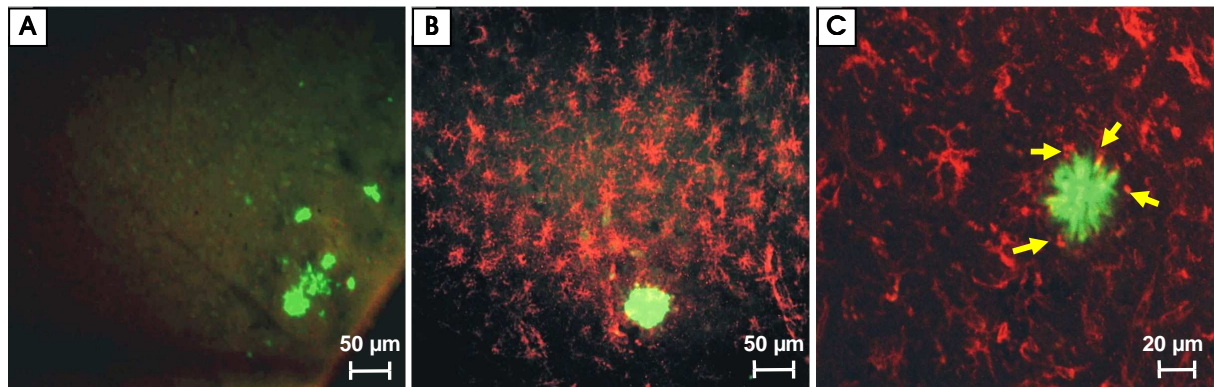


Abb. 4.2.3.2.a: Fluoreszenz-Doppelmarkierung Mikroglia mittels F4/80 (rot) und β -Amyloid-Plaques mittels Thio-S (grün) im entorhinalen Kortex von transgenen Mäusen der Altersgruppe 13,5 Monate
Scheininfiziertes, transgenes Kontrolltier mit Thioflavin-S-positiven β A-Plaques, aber ohne aktivierte Mikroglia (A). BDV-infiziertes transgenes Tier mit aktivierter Mikroglia (rot) und einem Thioflavin-S-positivem β A-Plaque (grün) (B). Interaktion von aktivierter Mikroglia (rot) und kompaktem β A-Plaque (grün) in einem BDV-infizierten, transgenen Tier (gelbe Pfeile in C).

Nach Doppelmarkierung mit Thioflavin-S und GFAP-Antiserum wurden einzelne **Astrozyten** in Plaquenähe aufgefunden, die Kriterien einer Aktivierung aufwiesen. Diese regional stark beschränkte astrogliale Aktivierung war unabhängig von der BDV-Infektion, da sie sowohl bei den transgenen, BDV-infizierten Tieren als auch bei den transgenen Kontrolltieren zu finden war. Plaqueeferne Astrozyten wiesen keine Aktivitätskriterien auf (siehe Abb. 4.2.3.2.b).

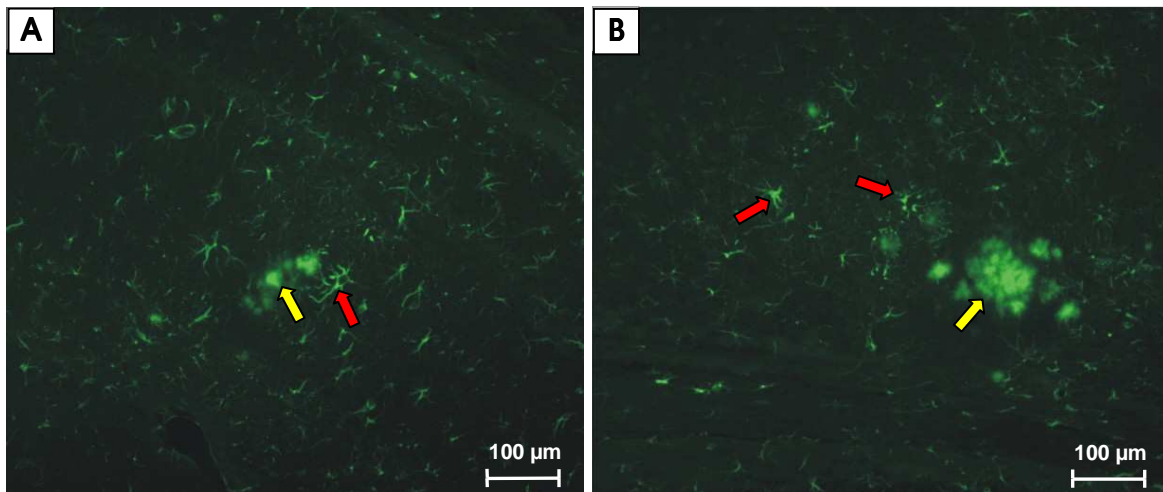


Abb. 4.2.3.2.b: Fluoreszenz-Doppelmarkierung von Astroglia mittels GFAP und β -Amyloid-Plaques mittels Thioflavin-S im entorhinalen Kortex von transgenen Mäusen der Altersgruppe 13,5 Monate
Scheininfiziertes, transgenes Kontrolltier (A) und BDV-infiziertes, transgenes Tier (B) mit β A-Plaques (gelbe Pfeile) sowie aktivierten Astrozyten (rote Pfeile) in Plaquenähe.

4.2.4 β -Amyloid-Peptid-Quantifizierung mittels Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Neben den oben erläuterten mikroskopischen und histometrischen Befunden wurde auch ein biochemischer Vergleich der β -Amyloid-Belastung zwischen hAPP-transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren und hAPP-transgenen, BDV-infizierten Tieren der drei Altersgruppen 11, 13,5 und 18 Monate mittels ELISA durchgeführt. Von jedem zu untersuchenden Tier wurden frontaler Kortex und Hippokampus einer Hirnhälfte präpariert und zu einer Probe gepoolt. Die Antikörper in den verwendeten ELISA-Kits detektierten sowohl die in SDS-Puffer nach Ultraschallhomogenisation lösliche Fraktion als auch die SDS-unlösliche, fibrilläre Fraktion der β -Amyloid₁₋₄₀- sowie der β -Amyloid₁₋₄₂-Peptide, die die Hauptkomponenten der Amyloid-Ablagerungen darstellen (GOWING et al. 1994; SELKOE 1999). Die Ergebnisse des wiederholt durchgeführten ELISAs waren allerdings uneinheitlich und durch unzureichende methodische Sicherheit schwer interpretierbar. Aus diesem Grund sind die ELISA-Ergebnisse hier nur exemplarisch für die Altersgruppe 13,5 Monate graphisch dargestellt. Die zugehörigen Daten-Tabellen aller drei Altersgruppen befinden sich im Anhang (Tab. 4.2.4.A, B und C in Anhang III, S. XXXVI/XXXVII).

In den **Altersgruppen 11 und 18 Monate** konnten in den zusammengefassten Proben aus frontalem Kortex und Hippokampus keine einheitlichen Trends beim Vergleich der transgenen, BDV-infizierten Mäuse mit den transgenen, scheininfizierten Kontrollmäusen registriert werden. Es fanden sich lediglich unregelmäßige Unterschiede in einzelnen β -Amyloid-Peptid-Fractionen, die jedoch keine einheitlichen Tendenzen widerspiegeln.

Nur in der **Altersgruppe 13,5 Monate** war eine Tendenz zur geringeren β -Amyloid-Belastung in den Gehirnen der BDV-infizierten, transgenen Tiere gegenüber den nicht infizierten, transgenen Kontrolltieren auch im ELISA feststellbar (siehe Abb. 4.2.4.a).

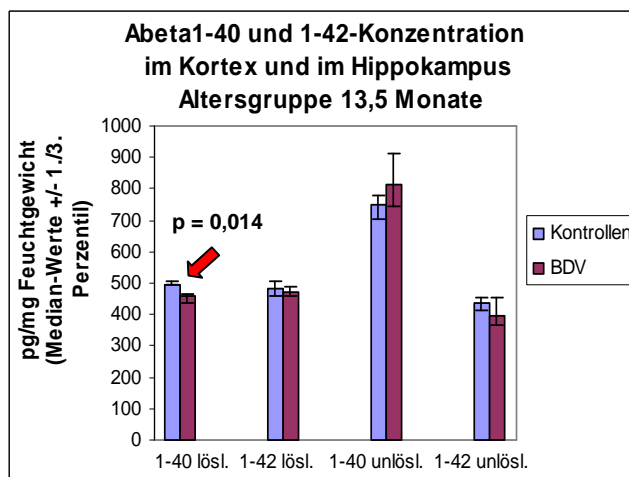


Abb. 4.2.4.a: Vergleich der β A₁₋₄₀- und β A₁₋₄₂-Konzentration zwischen transgenen Kontroll- und BDV-Tieren der Altersgruppe 13,5 Monate

Dargestellt sind die Medianwerte \pm 1./3. Perzentil von vier scheininfizierten, transgenen Kontrollmäusen (blau) und fünf BDV-infizierten, transgenen Mäusen (violett) in pg/mg Feuchtwicht Hirnmasse.

Mit Ausnahme des unlöslichen β A₁₋₄₀-Peptids wurden stets tendenziell weniger zerebrale β -Amyloid-Gehalte der BDV-infizierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren registriert. Signifikante Unterschiede sind mit einem roten Pfeil gekennzeichnet; $p < 0,05$.

5 Diskussion

5.1 Das transgene hAPP-Mausmodell für die Alzheimersche Krankheit und Borna Disease Virus

Bei der Alzheimerschen Erkrankung handelt es sich um einen progressiven, neurodegenerativen Prozess, der durch eine massive Akkumulation von extrazellulärem β -Amyloid in Form von sogenannten „Amyloid-Plaques“ im Gehirnparenchym sowie durch die Ablagerung von β -Amyloid-Material in der Blutgefäßwand von Betroffenen charakterisiert ist (SELKOE 1999; TERRY et al. 1999). Mit diesen zerebralen Amyloid-Ablagerungen geht eine inflammatorische Reaktion einher. In der Vergangenheit wurde vielfach geschlossen, dass diese zerebrale inflammatorische Reaktion eine Ursache der neuronalen Degeneration sei und in erster Linie schädliche Auswirkungen haben würde (MCGEER & MCGEER 1998). Neuere Studien wiesen allerdings darauf hin, dass sich Teilaspekte des Entzündungskomplexes sogar förderlich auf die Bekämpfung der Alzheimer-Pathologie auswirken können (DICARLO et al. 2001, WYSS-CORAY et al. 2001a, 2002), was auch Vakzinierungsexperimente belegten (SCHENK et al. 1999; BARD et al. 2000, 2003).

In dieser Arbeit sollte durch Induktion einer moderaten, akuten, ZNS-spezifischen Inflammation untersucht werden, ob es durch die induzierten inflammatorischen Prozesse im Gehirn zu Mikroglia-Aktivierung mit nachfolgender Verstärkung der AD-Plaques-Pathologie – oder aber zu einem protektiven Effekt durch akut induzierte Mikroglia-Aktivierung im Sinne einer β -Amyloid-Reduktion – kommt.

In unserer Studie stellt die intrazerebrale Infektion von hAPP-transgenen Mäusen mit dem Borna Disease Virus den Stimulus für eine gezielte entzündliche Reaktion mit akuter Mikroglia-Aktivierung dar. Für diese gezielte Induktion einer zentralnervösen Entzündung, die primär durch mikrogliale Aktivierung gekennzeichnet ist, wurde das Borna Disease Virus verwendet, da dieses Virus der Auslöser einer gut charakterisierten, immunologischen Reaktion ist. Das Virus ruft insbesondere eine zentralnervöse, nonpurulente Inflammation hervor, die sich vor allem im Hippokampus und im Neokortex manifestiert, also an den Lokalisationen, die auch Prädispositionsstellen der β -Amyloid-Plaques-Formation sind. Daher wurde eine BDV-induzierte Mikroglia-Aktivierung in unmittelbarer Nähe der Plaques erreicht. Die von uns verwendete transgene Tg2576-Mauslinie ist aufgrund genetischer Determination (siehe Literaturübersicht 2.2.3) nicht empfänglich für einen klinisch-neurologischen BDV-Krankheitsverlauf, sodass diese Mäuse post infectionem bis zum Abschluss der Untersuchungen klinisch unauffällig blieben und nicht vorzeitig infektionsbedingt starben.

Mikroglia ist - neben der Astroglia - die Zellpopulation des Gehirns, die sich vorrangig an der inflammatorischen Reaktion im Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt. Mikroglia-Aktivierung kann insbesondere durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α und weiterer neurotoxischer Faktoren, wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate, Komplement-Proteine zu neurodegenerativen Prozessen beitragen (GONZALEZ-SCARANO & BALTUCH 1999; AKIYAMA et al. 2000; MCGEER & MCGEER

2001; EIKELENBOOM et al. 2002; ROGERS et al. 2002). Andererseits deuten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen *in vitro* sowie auch *in vivo* auf eine potentielle Beteiligung von Mikrogliazellen an der Clearance der β -Amyloid-Ablagerungen und somit an der Verhinderung β A-bedingter schädlicher Effekte im Gehirn hin (siehe Literaturübersicht 2.1.3.2). Des Weiteren sind aktivierte Mikrogliazellen in der Lage, auch antiinflammatorische Moleküle, wie IL-10, TGF- β 1, Lipoxine und Prostaglandin E2 zu produzieren sowie die Synthese von proinflammatorischen Faktoren, wie TNF- α und IL-12 zu unterbinden (VOLL et al. 1997; FADOK et al. 1998, 2000; MCDONALD et al. 1999; GODSON et al. 2000; DEGROOT et al. 2001; ANDERSON & MOSSER 2002).

Um die Erforschung von Interaktionen zwischen Mikroglia, inflammatorischen Prozessen sowie β -Amyloid-Plaques im Rahmen der Alzheimer-Pathologie zu ermöglichen, wurden verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt, die Teilaspekte der AD-pathologischen Situation modellieren. In dieser Studie wurden transgene Tg2576-Mäuse verwendet, die die schwedische Mutation des humanen *app695* überexprimieren und die daher von Geburt an humane β -Amyloid-Peptide produzieren, welche sich progressiv im Mäusegehirn zu β -Amyloid-Ablagerungen formieren. Da diese Mauslinie neben der Plaque-Formation auch kognitive Defizite ausbildet (KOTILINEK et al. 2002), stellt sie ein weitgehend authentisches Modell zur Untersuchung der humanen Alzheimer-Pathologie dar. Das Tg2576-Mausmodell eignet sich gut zur Charakterisierung der Amyloid-Plaque-Formation und der damit einhergehenden inflammatorischen Reaktion (HSIAO et al. 1996; IRIZARRY et al. 1997; FRAUTSCHY et al. 1998; MEHLHORN et al. 2000; SOMMER et al. 2000; APELT & SCHLIEBS 2001; APELT et al. 2004), die im Mausmodell jedoch moderater ist als in der humanen Pathologie. Des Weiteren bilden die Tg2576-Mäuse keine neurofibrillären Bündel (NFTs) mit extensiver Neurodegeneration aus.

5.1.1 Charakterisierung der BDV-induzierten Inflammation im ZNS

Einleitend wird hier auf ein methodisches Problem beim immunhistochemischen Nachweis von BDV hingewiesen: Der uns zur Verfügung stehende monoklonale Maus-Antikörper, der gegen das virale Nukleoprotein p40 gerichtet ist, erforderte die Verwendung eines gegen Maus-IgG-gerichteten sekundären Antikörpers. Damit verbunden waren unterschiedlich stark ausgeprägte, unspezifische Hintergrundmarkierungen in den zu untersuchenden Mäusegehirnschnitten. Allerdings war die spezifische Markierung infizierter Zellen in allen untersuchten Gehirnschnitten so deutlich, dass sie sich eindeutig von der diffusen Hintergrundfärbung absetzte. Somit wurde die Auswertung dieser immunhistochemischen Reaktion trotz der Auswahl eines aufgrund identischer Detektions- und Target-Spezies suboptimalen Primärantikörpers nicht beeinträchtigt.

5.1.1.1 Lymphozytäre und gliale Reaktionen sowie Zytokinexpression in jungen Mäusen (Höchstalter: Vier Monate) ohne β -Amyloid-Plaque-Formation

In den Vorversuchen wurden Tg2576-Mäuse im Alter von 14 Tagen intrazerebral BDV-infiziert. Anschließend wurden deren Gehirne zwei, vier und 14 Wochen p.i. untersucht, um Art, Verlauf und Lokalisation viral induzierter Inflamationsprozesse vor dem Einsetzen Transgen-

induzierter Inflammation zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigten erwartungsgemäß große Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Befunden:

Alle BDV-infizierten Tg2576-Mäuse zeigten eine deutliche Präsenz von viralem Nukleoprotein in Neuronen und in Astrozyten, insbesondere im Hippokampus, aber auch im gesamten Kortexbereich. In diesen Hirnregionen wurden mittel- bis hochgradige inflammatorische Reaktionen registriert (siehe Tiere, Material und Methoden 3.3.4), die streng BDV-spezifisch waren, da sie nur bei den BDV-infizierten Mäusen, nicht aber bei den parallel untersuchten, nicht infizierten Kontrollmäusen zu finden waren. Diese BDV-induzierten Reaktionen beinhalteten CD₄- und CD₈-lymphozytäre Infiltrationen, vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine sowie eine deutliche mikrogliale Aktivierung (siehe Ergebnis-Teil 4.1).

CD₈-T-Zellen sind die vorherrschenden zytotoxischen Effektorzellen bei den unterschiedlichsten, viral bedingten, entzündlichen Vorgängen im ZNS. Nach Infektion mit dem Borna Disease Virus ist das Nukleoprotein des Virus das Hauptziel der krankheitsauslösenden, antiviralen CD₈-T-Zell-Antwort (PLANZ et al 1993; BILZER & STITZ 1994; HALLENSLEBEN et al. 1998; HAUSMANN et al. 2001; SCHAMEL et al. 2001; RAUER et al. 2004). CD₄-T-Zellen agieren dagegen als Helferzellen, deren direkte zytotoxische Effekte nur eine sehr limitierte Rolle spielen (PLANZ et al. 1995; SOBBE et al. 1997). Bei meinen Untersuchungen an den BDV-infizierten Tg2576-Mäusen dominierte die CD₄-T-Zell-Subpopulation in den lymphozytären Infiltrationen, während CD₈-T-Zellen, welche die zytotoxischen Effektorzellen in der BDV-Immunpathogenese darstellen, nur in geringer Zahl nachweisbar waren. Diese Befunde erklären, warum es in unseren Untersuchungen zu keiner offensichtlichen Reduktion der Neuronenzahl kam und klinisch-manifeste BDV-Symptome der BDV-infizierten Mäuse ausblieben.

Die ausschließlich in den Gehirnen der BDV-infizierten Mäuse auftretenden deutlichen CD₄-lymphozytären Reaktionen sowie die vereinzelt CD₈-lymphozytären Infiltrate sind spezifisch auf den durch die BDV-Infektion ausgelösten inflammatorischen Stimulus zurückzuführen, da in den Gehirnen der scheininfizierten Kontrolltiere niemals CD₄- und CD₈-Zellen nachgewiesen werden konnten.

CD₄-T-Helferzellen werden in zwei Subpopulationen unterschieden: **Th₁-Zellen** induzieren die zelluläre, „klassische“ Immunantwort und aktivieren die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 und IL-12. Dadurch werden Makrophagen aktiviert und zytotoxische CD₈-T-Zellen zur Proliferation angeregt. Ausgelöst wird eine solche Immunantwort vorrangig durch IFN- γ und IL-12 insbesondere im Rahmen einer Bekämpfung bakterieller oder viraler Infektionen (MOSMANN & SAD 1996; O`GARRA 1998). **Th₂-Zellen** induzieren die humorale, „alternative“ Immunantwort; sie aktivieren die Sekretion von TGF- β , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, wodurch primär B-Zellen zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern stimuliert werden. Des Weiteren wird die Th₁-Antwort durch Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10) reguliert (MOSMANN & SAD 1996; O`GARRA 1998). In unserem Mausmodell liegt nach der BDV-Infektion eine „gemischte“ Immunantwort vor, da Zytokine sowohl aus der Th₁- als auch aus der Th₂-Antwort exprimiert wurden. Wahrscheinlich ist eine Transformation von einer akuten, zellulären Th₁-Immunantwort zu einer chronischen, humoralen Th₂-Antwort, ähnlich der für Ratten beschriebenen BDV-Immunreaktion (HATALSKI et al. 1998). Die Zytokine werden insbesondere von Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen während einer viral

induzierten Immunreaktion exprimiert und stellen potente Aktivatoren von Mikrogliazellen dar (MEHLHORN et al. 2000; APELT & SCHLIEBS 2001; DE GROOT et al. 2001; LUE et al. 2001; VON BERNHARDI & RAMIREZ 2001; HANISCH 2002; ROGERS et al. 2002; DUFFIELD 2003; HAUSMANN et al. 2005; MONSONEGO et al. 2006). Diese Zytokinspektren erwiesen sich neben den immunhistochemischen Untersuchungen als ein geeignetes Instrument zur Erfassung der durch den BDV-Stimulus hervorgerufenen entzündlichen Reaktionen. Allerdings bestand eine schlechte Vergleichbarkeit der einzelnen RPA-Experimente insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Güte der Sondenmarkierung sowie der Hybridisierung. Die standardisierte Probenaufarbeitung sowie die Verwendung von Kontrolltieren als „externen“ Standard ermöglichten jedoch vergleichende Auswertungen. Kritisch anzumerken ist außerdem, dass in unseren Untersuchungen auf Grund der schwachen Signalexpression und der geringen Tierzahlen keine densitometrischen Messungen vorgenommen wurden. Die Analyse erfolgte durch optisches Ablesen und Zuordnen der aufgetrennten Banden auf den Gelen. Die Erfassung einzelner Zytokine nur bei BDV-Tieren könnte möglicherweise durch eine geringe Sensitivität hervorgerufen worden sein. Die gleichzeitige Beurteilung der als interne Standards für die Normalisierung der eingesetzten Gesamt-RNA dienenden, konstitutiv-exprimierten Gene – die auch densitometrisch erfasst wurden – bietet aber eine hinreichende Sicherheit für die Ableitung der qualitativen Aussagen zur Zytokinexpression.

Vor allem die proinflammatorischen Zytokine, wie IL-1 β und IL-6, waren nur bei den BDV-infizierten Mäusen zu finden, die Kontrolltiere exprimierten diese Zytokine nicht. Möglicher Ursprung der untersuchten Zytokine ist in erster Linie aktivierte Mikroglia, aber auch Lymphozyten (QUAGLIARELLO et al. 1991) und Astrozyten; Neuronen hingegen exprimieren nur sehr wenige Zytokine, wie IL-1 α und IL-6 (MCGEER & MCGEER 1997, ZHAO & SCHWARTZ 1998).

IFN- γ war ebenfalls nur in den BDV-infizierten Mäusen zu finden, was dadurch begründet ist, dass dieses Zytokin von CD₄-T-Zellen und CD₈-T-Zellen produziert wird, welche in unseren Experimenten ausschließlich in BDV-infizierten Mäusen zu finden waren. Die Expression von IFN- γ , IL-12p40, IL-6, IL-10, IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra war insbesondere im Hippokampus und Neokortex von BDV-infizierten Tieren vier Wochen p.i. am deutlichsten ausgeprägt, während 14 Wochen p.i. nur noch wenige dieser Zytokine nachzuweisen waren. IL-1 α wurde vier Wochen p.i. zwar auch in Kontrolltieren schwach exprimiert, allerdings wiesen die BDV-infizierten Tiere eine stärkere Expression in diesen beiden Regionen auf.

Diese regionale Verteilung der Zytokinexpression korreliert mit den immunhistochemisch erhobenen Befunden der Lymphozyten- und Glia-Reaktion, die auch im Hippokampus und Neokortex am deutlichsten ausgeprägt war.

Die Zytokine IL-12p35, IL-18 und MIF wurden sowohl von BDV-infizierten Mäusen als auch von nicht infizierten Kontrollmäusen exprimiert. Für diese Mauslinie ist eine konstitutive Expression der beiden letztgenannten Zytokine beschrieben (MEHLHORN et al. 2000). Auch für Ratten ist die zerebrale konstitutive Expression dieser beiden Zytokine beschrieben (CULHANE et al. 1998; BACHER et al. 2002).

Trotz der in unseren BDV-infizierten Mäusen dominierenden Expression proinflammatorischer Zytokine blieb eine zytotoxische Schädigung und Zerstörung von Neuronen in den Mäusegehirnen aus. Eine Erklärung für die ausbleibende Lyse von Neuronen in unseren Untersuchungen liefert möglicherweise die deutliche Expression von IFN- γ ; dieses Zytokin

wirkt neuroprotektiv, da es eine immunvermittelte Zell-Zerstörung verhindert und eine nicht zytolytische Virusreduktion in Neuronen vermittelt (HAUSMANN et al. 2005). Die Mechanismen, wie dieser protektive Effekt im Einzelnen bewerkstelligt wird, sind noch unklar.

Zur Untersuchung der Astroglia wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) verwendet, das einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts der Astrozyten darstellt. Neben der spezifischen Markierung von Astrozyten eignet er sich auch als diagnostischer Indikator für den Aktivierungszustand, da die GFAP-Expression nach einer Aktivierung von Astrozyten, zum Beispiel durch Verletzungen oder durch zerebrale Infektionen, ansteigt (RESKE-NIELSEN et al. 1987; ENG et al. 2000).

Es wurde keine erhöhte GFAP-Immunoreaktivität bei den BDV-infizierten Mäusen registriert. Wie bereits von HALLENSLEBEN et al. (1998) beschrieben, wurde auch in unseren Versuchen nach BDV-Infektion keine Veränderung in Anzahl, Morphologie, GFAP-Färbintensität oder -lokalisation der Astroglia festgestellt. Die BDV-Infektion führte also zu keiner von uns messbaren Astroglie. Nur im Hirngewebe um den Stichkanal sowohl der BDV-infizierten als auch der scheininfizierten Tiere wurde eine lokal begrenzte, narbenähnliche Astroglia-Aktivierung registriert, die aber auf die mechanische Läsion des Gewebes zurückgeführt werden kann.

Die lektinhistochemische Darstellung von Mikroglia mit GSA zeigte deutliche Unterschiede zwischen nicht infizierten Kontrolltieren und BDV-infizierten Tieren. Die in den Gehirnen der BDV-infizierten Mäuse markierten Mikrogliazellen wiesen durch ihre rundlichen Zellkörper mit den kurzen, plumpen, kaum verzweigten Fortsätzen sowie durch ihre hohe α -D-Galaktose-Expression, die sich durch eine intensive Braunfärbung nach GSA-Bindung manifestierte, deutlich Kriterien einer mikroglialen Aktivierung auf (GIULIAN & BAKER 1986; STREIT et al. 1988; GRAEBER & STREIT 1990; GRAEBER et al. 1990; WILLIAMS et al. 1992; ROGERS & LUE 2001). In nicht infizierten Kontrolltieren fand sich hingegen ausschließlich ruhende Mikroglia mit schlanken, schwach markierten Zellkörpern und langen, fein verzweigten Fortsätzen. Im Gegensatz zur Astroglia (siehe Abb. 4.1.1.1.b, S. 42) wurde in Mikrogliazellen zu keinem Zeitpunkt eine Expression des viralen Nukleoproteins nachgewiesen.

Das Ausbleiben einer mikroglialen Aktivierung bei den nicht infizierten Kontrolltieren zeigt, dass die Mikrogliazellen spezifisch durch die BDV-Infektion aktiviert wurden. Die Mechanismen einer Mikroglia-Aktivierung sind vielfältig und die von aktivierter Mikroglia induzierten Effekte hängen von der Art ihrer Stimulation ab (TOWN et al. 2005; BLOCK et al. 2007). Ein wichtiger Aktivierungs-Mechanismus wird über sogenannte Pattern recognition receptors (PRRs) vermittelt; dabei handelt es sich um Rezeptorproteine, die von Immunzellen exprimiert werden, um mikrobielle Pathogene (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) zu identifizieren, wie beispielsweise LPS, Parasiten, bakterielle oder virale Nukleinsäuren (DHIB-JALBUT et al. 1994; PETERSON et al. 1995; FISCHER et al. 1997; PRINZ et al. 1999; SCHLUESENER et al. 2001). Erkennung von mikrobiellem Fremdmaterial durch den PRR stimuliert die Mikrogliazelle zu Phagozytose und/oder Induktion von zytotoxischen Mechanismen (ALOISI 2001). Zu den PRRs gehören zahlreiche Rezeptorfamilien, wie beispielsweise die Toll-like Rezeptoren (TLR). Mikroglia exprimieren die TLRs 1-9 in Abhängigkeit von dem erkannten Pathogen (BSIBSI et al. 2002; OLSON & MILLER 2004; MCKIMMIE & FAZAKERLEY 2005).

Möglicherweise wurde die RNA oder andere Bestandteile des Borna Disease Virus durch einen dieser Toll-like Rezeptoren auf der Mikrogliazelle erkannt, die dadurch aktiviert würde; beispielsweise spielt TLR-2 eine wichtige Rolle bei der mikroglialen Reaktion auf virale Infektionen (ARAVALLI et al. 2005; BLOCK et al. 2007).

Ein potenter Mikroglia-Aktivator ist IFN- γ , welches insbesondere von der Th₁-Subpopulation der CD₄-T-Zellen sowie von NK-Zellen produziert wird und welches eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung infektiöser Agenzien durch Mikroglia spielt (GAZZINELLI et al. 1991; STOLL et al. 2000; ALOISI 2001; MORAN et al. 2004). Aktivierung von Mikroglia durch IFN- γ führt zu direkter Induktion von MHC-II-Expression sowie Antigen-Präsentation, Degradation von Proteinen, Aktin-Bindung, Zelladhäsion, Apoptosis und Zell-Signal-Kaskaden (MORAN et al. 2004). Die Infektion mit BDV führt zu einer deutlichen IFN- γ -Expression, daher ist die Aktivierung von Mikroglia durch dieses Zytokin in unseren Untersuchungen wahrscheinlich. Neben diesem am besten charakterisierten Mikroglia-Aktivator verfügen Mikroglia auch über weitere Zytokinrezeptoren; so reagieren Mikrogliazellen auf IL-1 mit erhöhter Zytokin- (CHAO et al. 1995a) und Chemokinproduktion (MCMANUS et al. 1998), und auch TNF- α aktiviert Mikrogliazellen und induziert mikrogliale Phagozytose sowie die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (CHAO et al. 1995a, b; SMITH et al. 1998; BECHER et al. 2000; NADEAU & RIVEST 2000).

BDV-induzierte inflammatorische Reaktionen waren vier Wochen p.i. prominent ausgeprägt und 14 Wochen p.i. überwiegend abgeklungen und nur noch vereinzelt und abgeschwächt nachzuweisen.

Bei diesen mit 14 Lebenstagen infizierten Mäusen wurden – sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den BDV-infizierten Gruppen – keine Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Wildtyp-Tieren festgestellt. In diesen frühen Stadien (Höchstalter: Vier Monate) hat die Transgen-verursachte Synthese humanen Amyloids also noch nicht zu einer Voraktivierung von Entzündungsmechanismen geführt, die mit den Entzündungsreaktionen auf das Virus interferieren.

5.1.1.2 Lymphozytäre und gliale Reaktionen in alternden Mäusen (11, 13,5 und 18 Monate) mit progressiver β -Amyloid-Plaque-Formation

In den Untersuchungen zur β -Amyloid-Belastung wurden die im Alter von 11, 13,5 und 18 Monaten BDV-infizierten Tg2576-Mäuse ebenfalls vier Wochen p.i. untersucht, da die BDV-spezifische inflammatorische Reaktion in den Gehirnen der jungen Mäuse zu diesem Zeitpunkt die deutlichste Ausprägung zeigte.

Im Gegensatz zu der massiven BDV-Antigenexpression von Neuronen und Astroglia in den mit 14 Lebenstagen infizierten jungen Mäusen waren in den Gehirnen der spät BDV-infizierten Tiere (11, 13,5 und 18 Monate) weniger BDV-infizierte Zellen zu finden. Diese waren vier Wochen p.i. vorrangig im Bereich des Kortex und des Hippokampus nachweisbar (siehe Abb. 4.2.1.1.c, S. 55). Die gleichzeitige Reduktion der Nukleoproteinexpression in transgenen und Wildtyp-Mäusen lässt die beginnende Amyloid-Ablagerung als Ursache ausscheiden. Wesentlich wahrscheinlicher ist die Ursache in der schon 1998 von der Arbeitsgruppe um HALLENSLEBEN angeführten, generellen Altersabhängigkeit der BDV-induzierten Pathologie

bei Mäusen zu suchen: Die deutlich höhere Empfänglichkeit neonataler MRL-Mäuse für eine BDV-induzierte Meningoenzephalitis wird unter anderem auf eine effizientere periphere Aktivierung von T-Zellen in adulten Tieren zurückgeführt. Dies führt zu einer schnellen Reduktion der viralen Belastung und zu einer symptomlosen Koexistenz von Wirt und Virus. Die Arbeitsgruppe um HAUSMANN (2005) untermauerte diese Theorie; sie beobachteten eine deutlich erhöhte Resistenz alter MRL-Mäuse gegenüber der Infektion mit BDV. Sie lieferten Hinweise, dass diese Resistenz vorrangig auf eine nicht zytolytische Reduktion infizierter Zellen zurückgeht, die an die Expression von IFN- γ und die effiziente periphere Aktivierung von CD₈-T-Zellen gebunden ist.

Die im Alter von 11, 13,5 und 18 Lebensmonaten BDV-infizierten Mäuse zeigten trotz der verhältnismäßig geringen Anzahl BDV-infizierter Zellen deutlich ausgeprägte lymphozytäre Infiltrationen, die in Quantität und Lokalisation den BDV-spezifischen Lymphozyten-Reaktionen der Vorversuche entsprachen. Auch bei diesen älteren Tieren dominierte die CD₄-T-Zell-Subpopulation, während CD₈-T-Zellen nur sehr vereinzelt anzutreffen waren.

Dieser Befund steht scheinbar im Gegensatz zu der von HAUSMANN und Kollegen (2005) aufgestellten Theorie, dass CD₈-Zellen für eine effiziente Virusreduktion in adulten Tieren essentiell sind. Allerdings führt ein schnelles peripheres Priming von CD₈-Zellen zu einer schnellen, nicht zytolytischen Virusreduktion. Durch diese effiziente Immunantwort in den alten Tieren war kurz nach der Infektion nur noch wenig zerebrales Antigen vorhanden, sodass es auch nur zu einer geringen Infiltration von Antigen-spezifischen CD₈-T-Zellen kam, da diese nur dann in das Gehirn einwandern, wenn ihnen ihr spezifisches Antigen über MHC-I-Moleküle von Endothelzellen im Gefäßlumen präsentiert wird (GALEA et al. 2007). Ein wichtiger Faktor für das Ausbleiben von prominenten CD₈-T-Zellinfiltrationen in unseren Untersuchungen ist der von uns verwendete Mausstamm, der aufgrund seines Haplotyps nicht in der Lage ist, eine CD₈-zelluläre Immunantwort zu induzieren (siehe Literaturübersicht 2.2.3). Auch der Grad der T-Zellinfiltration wies keine Genotyp-Abhängigkeit auf, blieb also unbeeinflusst von Amyloid-Ablagerungen in alten transgenen Tieren.

Nur in der Altersgruppe 11 Monate wurde in vier von fünf Tieren eine deutliche Astrogliose nach BDV-Infektion registriert. In den untersuchten Altersgruppen 13,5 und 18 Monate waren, wie in den Vorversuchen und in der Literatur beschrieben (HALLENSLEBEN et al. 1998), keine quantitativen oder morphologischen Unterschiede zwischen der Astroglia der BDV-infizierten Mäuse und der von nicht infizierten Kontrollmäusen festzustellen, sodass hier keine astrogliale Aktivierung vorlag. Der Befund der ausschließlich in einer einzigen Altersgruppe auftretenden, BDV-induzierten Astrogliose ist schwierig zu begründen, da keine zusätzliche Auffälligkeit in den Tieren dieser Altersgruppe, wie erhöhte BDV-Nukleoproteinexpression oder T-Zellinfiltration im Vergleich zu den BDV-Tieren der anderen Altersgruppen, vorlag. Möglicherweise liefert die besondere Ausgangssituation in der Altersgruppe 11 Monate, die durch beginnendes Altern sowie durch die in diesem Alter einsetzende β -Amyloid-Ablagerung und -Formation zu kompakten Plaques charakterisiert ist, eine Erklärung; demnach könnte die Astroglia durch diese beginnenden Milieu-Veränderungen, die in den Altersgruppen 13,5 und 18 Monate keinen akuten Reiz mehr darstellten, voraktiviert gewesen sein ohne morphologische Auffälligkeiten zu entwickeln. Diese so voraktivierten Astrozyten reagierten auf die BDV-Infektion mit der beschriebenen Aktivierung, während in den anderen Altersgruppen -

aufgrund einer anderen Ausgangssituation zum Zeitpunkt der Infektion - keine Astrogliose induziert wurde.

Methodische Faktoren können für die Abweichung der Astroglia-Reaktion nach BDV-Infektion in der Altersgruppe 11 Monate nicht ganz ausgeschlossen werden, wie beispielsweise die Zugehörigkeit der Tiere zu zwei Würfen, die zur Infektion verwendete Virus-Charge und Kreuzkontamination mit anderen, im Versuchsstall experimentierten Erregern. Allerdings waren die Experimente in den anderen Altersgruppen mit denselben Faktoren konfrontiert, sodass eine methodische Erklärung unwahrscheinlich ist.

Für die Darstellung der Mikroglia in den Altersgruppen 11, 13,5 und 18 Monate wurde das GSA-Lektin durch den monoklonalen Antikörper F4/80 ersetzt, der spezifisch eine Membrankomponente in murinen Makrophagen, also auch in Mikroglia, detektiert (AUSTYN & GORDON 1981; HUME et al. 1984). Der Vorteil von F4/80 gegenüber dem Lektin liegt in der spezifischeren Mikroglia-Darstellung sowie in der geringeren Hintergrundfärbung, die insbesondere durch Lektin-markierte Gefäße bedingt war. Die scheininfizierten Kontrolltiere der Altersgruppen 11 und 13,5 Monate zeigten in allen untersuchten Hirnregionen vorwiegend ruhende Mikrogliazellen. In der Altersgruppe 18 Monate wiesen zwei von drei transgenen, scheininfizierten Kontrolltieren neben den vorherrschenden ruhenden Mikrogliazellen sehr vereinzelt auch plumpere, kräftiger markierte Mikrogliazellen auf, während sich in Kontrolltieren vom Wildtyp ausschließlich ruhende Mikrogliazellen fanden.

Die BDV-infizierten Tiere aller drei Altersgruppen wiesen deutlich aktivierte Mikrogliazellen auf. In der Altersgruppe 18 Monate zeigten vier von sechs BDV-infizierten Mäusen eine schwächere mikrogliale Reaktion, als BDV-infizierte Mäuse der beiden jüngeren Altersgruppen; die Mikrogliazellen dieser Tiere waren weniger intensiv angefärbt und wiesen schlankere Somata auf. Möglicherweise waren die Mikrogliazellen dieser ältesten von uns untersuchten Mäusegruppe aufgrund von Zellalterungsprozessen nicht mehr in vollem Umfang in der Lage, adäquat auf einen gesetzten Reiz, wie die BDV-Infektion, zu reagieren. Die 2004 von STREIT etablierte Mikroglia-Dysfunktions-Theorie (siehe Literaturübersicht 2.1.3.3) würde eine solche Erklärung stützen. Auch die einzig in dieser Altersgruppe gemachte Beobachtung der veränderten Mikroglia-Morphologie in zwei von drei nicht infizierten, transgenen Kontrolltieren, die durch bulböse Zellkörper, dicke Fortsätze und stärkerer Färbeintensität von der typischen Zellform einer ruhenden Mikrogliazelle abwich, könnte durch eine mikrogliale Zellalterung bzw. -degeneration erklärt werden. Alternde, dystrophische Mikrogliazellen zeichnen sich morphologisch durch einen vergrößerten Zellkörper, geringeren Verzweigungsgrad der Fortsätze sowie durch einen phagozytotischen Phänotyp aus (SHENG et al. 1998; STREIT et al. 2004). Die Tatsache, dass Mikrogliazellen in diesen ältesten untersuchten Kontrolltieren – ohne inflammatorischen Stimulus – durch den F4/80-Antikörper stärker markiert wurden im Vergleich zu Kontrolltieren der beiden jüngeren Altersgruppen, deutet auf eine möglicherweise alterungsbedingte Veränderung der Zelloberflächenmoleküle hin. Auf diese Weise würde eine Beseitigung von degenerierenden Mikrogliazellen durch erleichterte Opsonierung und Phagozytose ermöglicht werden. Gegen diese Alterungs-Hypothese spricht jedoch die Tatsache, dass lediglich einige der **transgenen**, scheininfizierten Tiere diese veränderte Mikroglia-Morphologie aufwiesen, während sich in scheininfizierten Tieren vom **Wildtyp**, die keine Amyloid-Ablagerungen entwickelten, ausschließlich klassische

ruhende Mikrogliazellen fanden. Allerdings werden Mikrogliazellen in den Wildtyp-Tieren aufgrund der fehlenden Amyloid-Ablagerungen auch nicht so stark gefordert und beansprucht, sodass sie möglicherweise über eine längere Lebensdauer verfügen und zu diesem Zeitpunkt noch keine Alterungsmerkmale aufweisen.

Die lokale Aktivierung von Mikroglia in den BDV-infizierten Mäusen korrelierte mit dem Auftreten von Lymphozyten-Ansammlungen (siehe Abb. 4.2.1.1.j, S. 61). In jeder untersuchten Altersgruppe lag eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der lokalen, BDV-induzierten CD₄-T-lymphozytären Infiltration und dem Grad der mikroglialen Aktivierung vor (siehe Tab. 4.2.1.1.i, S. 61). An der Transformation vom Ruhezustand zur aktivierten Mikrogliazelle waren Botenstoffe, wie Zytokine beteiligt, die wahrscheinlich von den infiltrierten Lymphozyten ausgeschüttet wurden. Dafür spricht die Tatsache, dass in den nicht infizierten Kontrolltieren, die in keiner der untersuchten Hirnregionen CD₄- oder CD₈-T-Lymphozyten aufwiesen, überwiegend ruhende Mikroglia-Formen zu finden waren. Insbesondere das auch in diesem Modell nach BDV-Infektion exprimierte Zytokin IFN- γ nimmt eine Schlüsselfunktion in der Differenzierung von Mikrogliazellen zu reifen Antigen-präsentierenden Zellen ein und fördert darüber hinaus ihre Motilität sowie die Aufnahme-Kapazität von β -Amyloid (MONSONEGO et al. 2006).

Mikrogliazellen könnten aber auch über Rezeptoren (z.B. PRR oder FcR) durch das Borna Disease Virus bzw. durch opsonierte oder präsentierte BDV-Frakturen via B-Zellen aktiviert worden sein. Die nachfolgende mikrogliale Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren könnte dann wiederum sekundär die Ursache für CD₄-lymphozytäre Infiltrationen sein.

Bei der humanen Alzheimerschen Erkrankung werden Mikrogliazellen direkt durch β -Amyloid-Ablagerungen aktiviert. Die erste Beschreibung aktivierter, Plaque-benachbarter Mikroglia in humanen Alzheimer-Gehirnen erfolgte 1927 durch BOLSI und wurde mittels verschiedener Mikroglia-typischer Marker, wie des MHC-II-Antigens HLA-DR (MCGEER et al. 1987) und der Klasse A Scavenger-Rezeptoren (CHRISTIE et al. 1996) bestätigt.

Zur Erforschung der pathomorphologischen und pathogenetischen Prozesse im AD-Geschehen wurden verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt, die zwar alle eine der humanen AD-entsprechende, progressive β -Amyloid-Plaquesformation in den Gehirnen entwickeln, deren Plaque-assoziierte inflammatorische Reaktionen jedoch Modell-abhängig sehr viel moderater ausfallen als im humanen AD-Situs. Für die transgene Mauslinie APP23 allerdings ist eine prominente Mikroglia-Aktivierung und –proliferation in unmittelbarer Nähe von Amyloid-Ablagerungen sowie eine Freisetzung verschiedener inflammatorischer Mediatoren beschrieben (STALDER et al. 1999; BORNEMANN et al. 2001). Auch bei der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinie Tg2576 konnte die Arbeitsgruppe um FRAUTSCHY (1998) eine Plaque-induzierte Mikroglia-Aktivierung registrieren. APELT & SCHLIEBS (2001) berichteten, dass einzelne aktivierte Mikrogliazellen nur um fibrilläre, Thioflavin-S-positive β -Amyloid-Ablagerungen ab einem Alter von 13 Monaten in dieser transgenen Mauslinie Tg2576 zu finden waren, während reaktive Astroglia sowohl an fibrillären als auch an diffusen Amyloid-Ablagerungen vorhanden waren.

In unseren Untersuchungen an dieser Mauslinie Tg2576 konnte jedoch mittels den von uns verwendeten Markern GSA und F4/80 keine Aktivierung von Mikroglia in nicht behandelten Mäusen – auch nicht in der unmittelbaren Umgebung der Plaques – festgestellt werden. Eine

Ausnahme bildeten zwei von drei transgenen, scheininfizierten Tieren der Altersgruppe 18 Monate, die vereinzelt Mikroglia-Zellformen aufwiesen, die durch deutliche Markierung und dicke Zellkörper morphologisch von der Ruheform abwichen. Immunfluoreszenzmikroskopische Doppelmarkierungen zeigten, dass auch fibrilläre, Thioflavin-S-positive β -Amyloid-Ablagerungen keine mikrogliale Aktivierung in den Kontrolltieren induzierten (siehe Abb. 4.2.3.2.a, S. 72) und dass die Mikrogliazellen der BDV-infizierten Mäuse nicht ausschließlich in der Nähe der Amyloid-Ablagerungen, sondern großflächig-diffus aktiviert waren.

Die Darstellung von aktivierter Mikroglia hängt neben dem Mausmodell, dem Alter der Tiere und dem Aktivierungs-Stimulus (siehe 5.2.2) stark von dem verwendeten Marker ab. Während die Mikroglia-Marker Mac-1 (= CD_{11b} = Komplementrezeptor 3 (CR3)) und F4/80 in doppelt transgenen PS1 + APP-Mäusen weitgehend gleiche Markierungsprofile von mit Amyloid-Ablagerungen assoziierten, aktivierten Mikrogliazellen aufwiesen (GORDON et al. 2002), zeigte der F4/80-Antikörper in Tg2576-Mäusen eine geringere Mikroglia-Markierungsintensität als der Mac-1-Antikörper (SASAKI et al. 2002). Auch in unserem Mausmodell wurden mittels Mac-1-Antikörper Mikrogliazellen nicht infizierter, transgener Kontrolltiere in unmittelbarer Umgebung der β -Amyloid-Ablagerungen mit Anzeichen von Aktivierung markiert, während der F4/80-Antikörper an Folgeschnitten desselben Tieres keine Markierung zeigte (persönliche Mitteilung Dr. T. Stahl, Leipzig, 2006). Des Weiteren gibt es mindestens zwei verschiedene mikrogliale Aktivitäts-Phänotypen (siehe 5.2.1), die in Abhängigkeit vom jeweiligen neuronalen Umfeld entweder als Phagozyten oder als Antigen-präsentierende Zellen ganz unterschiedliche Effekte ausüben (TOWNSEND et al. 2005). Die verschiedenen Aktivitäts-Phänotypen exprimieren unterschiedliche Oberflächenmoleküle, für die jeweils spezifische Marker zur Darstellung von mikroglialer Aktivierung benötigt werden. Die Vielzahl dieser Marker wurde von MORGAN et al. (2005) zusammengefasst. Diese Aspekte liefern eine Erklärung für den scheinbaren Gegensatz zwischen den Befunden anderer Arbeitsgruppen, die eine Mikroglia-Aktivierung durch die β -Amyloid-Ablagerungen – wie es auch im humanen AD-Situs der Fall ist – registrierten und der von uns gemachten Beobachtung der fehlenden mikroglialen Aktivierung in unmittelbarer Umgebung der Plaques. Auch SCHWAB et al. (2004) konnten keine der humanen Pathologie gleichende Mikroglia-Aktivierung in unmittelbarer Umgebung der β A-Plaques in dem transgenen Mausmodell APP23 finden, obwohl eine prominente Mikroglia-Aktivierung in demselben Mausmodell zuvor von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden war (STALDER et al. 1999; BORNEMANN et al. 2001). Da die sensitivste Mikroglia-Darstellung auch in anderen Untersuchungen mit dem F4/80-Antikörper erzielt wurde (STAHL 1998), wurde dieser Marker für unsere Studie ausgewählt.

5.2 BDV-induzierte Modulation der Alzheimer's Disease-Pathologie

Von zahlreichen Arbeitsgruppen wird angenommen, dass ein gewisser, moderater Grad an inflammatorischen und immunvermittelten Reaktionen – insbesondere jedoch eine Aktivierung von Mikrogliazellen – essentiell für die β -Amyloid-Clearance sei (MENTLEIN et al. 1998; WILCOCK et al. 2001, 2003, 2004b; WYSS-CORAY et al. 2002; BLASKO et al. 2003; D'ANDREA et al. 2004). In dieser Untersuchung wurden die Gehirne der transgenen Tg2576-Mäuse in den drei Altersgruppen 11 Monate, 13,5 Monate und 18 Monate vier Wochen nach

der BDV-Infektion untersucht und ihr Gehalt an Amyloid-Ablagerungen mit dem von gleichaltrigen transgenen, scheininfizierten Kontrollmäusen verglichen.

5.2.1 Einfluss der BDV-induzierten Mikroglia-Aktivierung auf den β -Amyloid-Gehalt in den Gehirnen der Kontrolltiere und der BDV-infizierten Tiere

Der β -Amyloid-Gehalt wurde mit drei verschiedenen Methoden erfasst: Mittels βA_{1-42} -Immunhistochemie wurden lösliche (= diffuse Mono-, Di- und Oligomere) und fibrilläre Ablagerungen detektiert, durch Ermittlung der Anzahl Thioflavin-S-positiver Signale wurden nur fibrilläre, kompakte βA -Ablagerungen erfasst und der ELISA ermöglichte die Erfassung sowohl von gelösten, also nicht abgelagerten, möglicherweise an Zellen gebundene βA_{1-40} - und βA_{1-42} -Fraktionen als auch von löslichen und fibrillären βA_{1-40} - und βA_{1-42} -Ablagerungen.

Die computergestützte, immunhistochemische Untersuchung der löslichen und fibrillären β -Amyloid $_{1-42}$ -Ablagerungen in definierten Hirnarealen mittels spezieller Analysen-Software (analySISPro®) ermöglichte ihre objektive und reproduzierbare Quantifizierung. Der verwendete polyklonale Primärantikörper erwies sich als gut geeignet. Der Detektions-Antikörper aus dem Kaninchen markierte das aus 42 Aminosäuren bestehende parenchymatöse und auch perivaskuläre β -Amyloid hochspezifisch; es traten keinerlei unspezifische Hintergrundmarkierungen auf, die die Farbschwellwert-definierte Auswertung empfindlich beeinträchtigt hätten. Das βA_{1-42} -Peptid spielt eine entscheidende Rolle in der AD-Pathogenese, da es im Gegensatz zu anderen βA -Peptiden - wie beispielsweise βA_{1-38} und βA_{1-40} - hydrophober ist und schneller zu stabilen βA -Oligomeren aggregiert (BURDICK et al. 1992; JARRETT et al. 1993; BITAN et al. 2003; CHEN & GLABE 2006), die die eigentlichen bioaktiven Substanzen darstellen (HAASS & SELKOE 2007).

Um regional bedingte Unterschiede zu vermeiden, wurden die Koronal-Hirnschnitte zunächst arealweise ausgewertet. Es wurden die Median-Werte der scheininfizierten Kontrollmäuse arealweise mit den Median-Werten der BDV-infizierten Mäuse verglichen.

In jeder Altersgruppe zeigten die BDV-infizierten Mäuse tendenziell einen geringeren Gehalt an β -Amyloid $_{1-42}$ -Ablagerungen als die scheininfizierten Kontrollmäuse in den korrespondierenden Hirnarealen. Noch deutlicher wurde diese Tendenz jeweils durch Zusammenfassung der einzeln ausgewerteten Hirnareale einer Koronalebene (siehe Abb. 4.2.1.2.g, S. 66).

In der Altersgruppe 11 Monate wurde im rostralen Bereich des somatosensorischen Kortex ein signifikant geringerer βA_{1-42} -Gehalt der BDV-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen gemessen (siehe Abb. 4.2.1.2.b, S. 63). Aufgrund der in diesem Lebensalter der transgenen Mäuse ohnehin noch relativ geringen Amyloid-Ablagerungen war die Tendenz des verminderten Amyloid-Gehaltes bei BDV-infizierten Mäusen jedoch nicht so deutlich, wie in der Altersgruppe 13,5 Monate, in der die ausgeprägtesten Effekte zu verzeichnen waren.

In dieser Altersgruppe wurde in allen untersuchten Arealen aller drei Koronalebenen ein tendenziell geringerer βA_{1-42} -Gehalt in den Gehirnen der BDV-infizierten Mäuse als in den entsprechenden Hirnarealen der nicht infizierten Kontrollmäuse registriert. Im Bereich des sekundären somatosensorischen und des perirhinalen Kortex aller drei Koronalebenen war

dieser Unterschied im β -Amyloid-Gehalt zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen signifikant (siehe Abb. 4.2.1.2.c, S. 63).

In der Altersgruppe 18 Monate wurden zwar auch geringere βA_{1-42} -Werte der BDV-Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen – insbesondere in den untersuchten Arealen der Bregma-Ebene -1,82 mm sowie bei der Zusammenfassung der einzelnen Areale zu den jeweiligen Bregma-Ebenen - ermittelt, allerdings waren in dieser Altersgruppe die Unterschiede zwischen BDV- und Kontrollmäusen nicht signifikant. Des Weiteren wurde in einzelnen Arealen sogar ein höherer β -Amyloid₁₋₄₂-Plaque-Gehalt bei den BDV-infizierten Mäusen registriert als in entsprechenden Arealen der nicht infizierten Kontrollmäuse (siehe Abb. 4.2.1.2.e, S. 65). In dieser Altersgruppe wurde sowohl bei Kontroll- als auch bei BDV-Mäusen eine massive β -Amyloid-Belastung gefunden. Da die β -Amyloid-Ablagerungen in diesem fortgeschrittenen Alter zahlreicher, größer und unlöslicher waren als die der Altersgruppe 13,5 Monate, fiel die Reduktion der βA -Ablagerungen in den BDV-infizierten Tieren der Altersgruppe 18 Monate geringer aus, als bei den BDV-infizierten Tieren der Altersgruppe 13,5 Monate. Nach der in der Literaturübersicht (2.1.3.3) dargestellten Mikroglia-Dysfunktions-Theorie (STREIT 2004; STREIT et al. 2004) könnten eingeschränkte β -Amyloid-Clearance sowie eingeschränkte Neuroprotektion durch Mikrogliazellen direkte Konsequenzen altersbedingter mikroglialer Dysfunktion und Degeneration sein. Diese Hypothese der mikroglialen Zellalterung und der damit einhergehende Funktionsverlust liefern eine Erklärung für die relativ geringe BDV-induzierte β -Amyloid-Reduktion bei den Tieren der Altersgruppe 18 Monate, denn vier von sechs BDV-infizierten Tieren zeigten eine schwächere mikrogliale Aktivierung als BDV-infizierte Tiere der anderen Altersgruppen. Diese Reduktion der β -Amyloid-Clearance in alten Tg2576-Mäusen wurde auch in aktiven (DAS et al. 2001) und passiven (ZHOU et al. 2005) Immunisierungsstudien beschrieben, in denen sieben bis zwölf Monate alte Mäuse eine deutliche βA -Reduktion, 16 bis 20 Monate alte Mäuse hingegen keine βA -Reduktion trotz gleich hoher anti- βA -Antikörper-Level zeigten. Die Arbeitsgruppen schlussfolgerten, dass neben der bereits erwähnten alterungsbedingten verminderten Mikroglia-Antwort auch altersabhängige Differenzen im Amyloid-Abtransport aus dem Gehirn für die fehlende Clearance in alten Mäusen mit massiver β -Amyloid-Belastung verantwortlich seien. LRP-1 (LDL receptor-related protein-1) ist beispielsweise ein wichtiges, am Abtransport von β -Amyloid aus dem Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke beteiligtes Molekül (SHIBATA et al. 2000; DEANE et al. 2004; ZLOKOVICH 2004). In alten Mäusen wird LRP-1 jedoch herabreguliert, was zu einer verstärkten βA -Akkumulation führt (SHIBATA et al. 2000).

Die von uns gemachte Beobachtung einer β -Amyloid-Reduktion nach provozierter Mikroglia-Aktivierung entspricht den Ergebnissen einer Studie, die im Jahr 2001 von der Arbeitsgruppe um DICARLO erzielt werden konnten: In dieser Studie wurden transgene APP+PS1-Mäuse intrahippokampal mit LPS – einem Endotoxin aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien – infiziert. Sieben Tage post infectionem wurden Gehirnschnitte der LPS-behandelten Mäuse und von Kontrollmäusen immunhistochemisch untersucht. Zur Detektion der β -Amyloid-Ablagerungen wurde von DICARLO derselbe polyklonale Antikörper verwendet, der auch in unseren Untersuchungen eingesetzt wurde. In den Gehirnen der LPS-behandelten Mäuse wurde eine Reduktion des βA -Gehaltes um 26 % verglichen mit den Gehirnen der unbehandelten Kontrolltiere registriert. Mit dem verringerten Amyloid-Gehalt der LPS-

behandelten Mäuse ging eine signifikant verstärkte mikrogliale Aktivierung einher, die mittels MHC-II-Immunhistochemie detektiert wurde. In dieser Studie von DICARLO et al. wurde erstmals an einem Tiermodell beschrieben, dass eine LPS-induzierte inflammatorische Reaktion, die vorrangig durch Mikroglia-Aktivierung charakterisiert ist, eine Reduktion der zerebralen β -Amyloid-Belastung bewirkt.

DICARLO et al. schlussfolgerten, dass moderate inflammatorische Prozesse die Clearance der β -Amyloid-Ablagerungen fördern würden, wenn sie gezielt und frühzeitig greifen würden, bevor sich massive fibrilläre Plaque-Cores gebildet hätten. Diese Schlussfolgerung lässt sich auch aus unseren Befunden ziehen, da die Mechanismen, die auch in unseren Versuchstieren eine β A-Reduktion bewerkstelligten, in den 18 Monate alten Tieren aufgrund der hochgradigen Plaque-Belastung vermutlich überfordert sind, während die zu einem früheren Zeitpunkt der Plaque-Formation (13,5 Monate) einsetzende β A-Clearance effektiver ist. In den von DICARLO verwendeten 11 und 16 Monate alten, transgenen APP+PS1-Mäuse setzt die β A-Ablagerung und -Formation zu kompakten Plaques früher ein (GORDON et al. 2002) als in den von uns verwendeten Tg2576-Mäusen, daher können unsere älteren Mäuse mit den APP+PS1-Mäusen verglichen werden.

Effektorzelle dieser Amyloid-Clearance ist nach DICARLO die aktivierte Mikrogliazelle, die erst nach LPS-Injektion eine signifikant verstärkte Aktivierung gegenüber den nicht behandelten Kontrolltieren zeigte. Weder in dem APP+PS1-Modell noch in unserem Tg2576-Modell wurde eine großflächige, effektive Mikroglia-Aktivierung in nicht behandelten, transgenen Kontrolltieren allein durch die sich formierenden β A-Ablagerungen induziert.

Zusätzlich zu der β A₁₋₄₂-Immunhistochemie wurde der Nachweis der kompakten, fibrillären Amyloid-Ablagerungen mittels Thioflavin-S-Färbung durchgeführt. Mit der Einlagerung des Flavoproteins in Amyloidstrukturen werden selektiv nur fibrilläre β -Amyloid-Ablagerungen erfasst. Die im Initialstadium der Plaqueformation auftretenden diffusen Plaques, die aus löslichem Amyloid bestehen, werden nicht durch das Thioflavin-S dargestellt.

Vorteilhaft an der fluoreszenzmikroskopischen β -Amyloid-Darstellung ist die scharfe Abgrenzung der fluoreszierenden Strukturen gegenüber dem Hintergrund sowie die spezifische Darstellung von fibrillärem Amyloid, durch welche der Einfluss der Mikroglia-Aktivierung selektiv auf diese Ablagerungen untersucht werden kann. Ein weiterer Vorteil besteht in der guten Darstellung von Amyloid-Material, welches in den Wänden von zerebralen Blutgefäßen abgelagert wurde, sogenanntes perivaskuläres Amyloid, sodass hier eine sehr gute Differenzierung von parenchymatösem und perivaskulärem β -Amyloid möglich war.

Die Auswertung der Thioflavin-S-Markierung erfolgte hirnearealweise durch zweifaches Blind-Zählen aller spezifisch fluoreszierenden Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop. Diese Auswertung ist allerdings methodisch-bedingt nicht so exakt, wie die histometrische β A-Quantifizierung, da die Abgrenzung der Hirnareale optisch erfolgte und daher keine Flächen-Normierung möglich war. Trotz zweifachen Zählens mit anschließender Mittelwert-Bildung konnten Fehler nicht ganz ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden lediglich Ereignisse gezählt, eine Aussage über die Größe bzw. die Fläche der gezählten Plaques wurde nicht getroffen. Unterschieden wurde jedoch in parenchymatöse und perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen.

Dennoch wurden die Ergebnisse aus der β -Amyloid₁₋₄₂-Immunhistochemie bestätigt: In allen drei Altersgruppen wurden tendenziell weniger Thio-S-positive, parenchymatöse β -Amyloid-Ablagerungen in den Hirnschnitten der BDV-infizierten Mäuse registriert als in den entsprechenden Hirnregionen von scheininfizierten Mäusen der jeweils gleichen Altersgruppe (siehe Abb. 4.2.3.1.c, S. 69 und Tab. und Abb. 4.2.3.1.Ia, IIa und IIIa in Anhang III, S. XXX, XXXII und XXIXV). Bereits in der Altersgruppe 11 Monate war trotz der altersbedingt noch sehr geringen Anzahl fibrillärer Amyloid-Ablagerungen in allen untersuchten Regionen eine Reduktion des fibrillären β A-Gehaltes in den BDV-infizierten Tieren erkennbar, die jedoch nicht signifikant war (siehe Abb. 4.2.3.1.c, S. 69 und Tab. und Abb. 4.2.3.1.Ia in Anhang III, S. XXX). Am deutlichsten zeigte sich die Reduktion Thio-S-positiver, parenchymatöser Plaques der BDV-infizierten Mäuse im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollmäusen wiederum in der Altersgruppe 13,5 Monate und hier insbesondere in der Bregma-Ebene -1,82 mm, in der die Reduktion signifikant war (siehe Abb. 4.2.3.1.c, S. 69 und Abb. 4.2.3.1.d, S. 70 sowie Tab. und Abb. 4.2.3.1.IIa in Anhang III, S. XXXII).

In der Altersgruppe 18 Monate wurde eine hochgradige Belastung der Mäusegehirne sowohl aus der BDV-Gruppe als auch aus der Kontrollgruppe mit Thio-S-positiven β -Amyloid-Material festgestellt. Auch in dieser Altersgruppe wurde in vielen Hirnarealen der BDV-infizierten Mäuse tendenziell weniger Thio-S-positive, parenchymatöse β -Amyloid-Ablagerungen registriert als in den korrespondierenden Hirnarealen der Kontrollmäuse; eine signifikante Reduktion war jedoch nur im Bereich des piriformen Kortex zu verzeichnen (siehe Tab. und Abb. 4.2.3.1.IIIa in Anhang III, S. XXXIV).

Das in den Wänden der zerebralen Blutgefäße, insbesondere im Bereich der Meningen und der Fissura hippocampi lokalisierte perivaskuläre β -Amyloid, das durch Thioflavin-S detektiert werden konnte, verhielt sich konträr zum parenchymatös lokalisierten β -Amyloid. In allen Altersgruppen wiesen hier die BDV-infizierten Mäuse tendenziell mehr perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in ihren Gehirnen auf als die nicht infizierten Kontrolltiere. Besonders deutlich war diese Tendenz in den Altersgruppen 13,5 und 18 Monate; hier war der Anteil von Thio-S-positivem Amyloid-Material in den Gefäßwänden bei den BDV-infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren in einem (18 Monate) bzw. zwei (13,5 Monate) ausgewerteten Regionen signifikant erhöht (siehe Abb. 4.2.3.1.e, S. 71). Dass es sich bei den perivaskulären Signalen um β -Amyloid handelte, wurde durch die immunhistochemische β A₁₋₄₂-Darstellung bestätigt, da dieser Antikörper ebenfalls neben parenchymatös lokalisiertem auch perivaskuläres β -Amyloid markierte (siehe Abb. 5.2.1.a.).

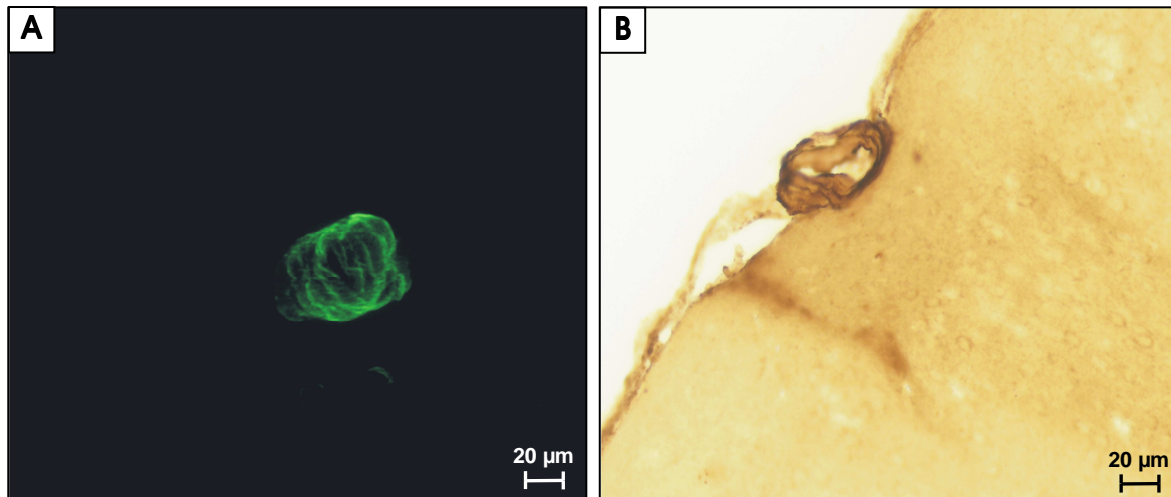


Abb. 5.2.1.a: Vaskuläres β -Amyloid in der Pia mater eines transgenen, BDV-infizierten Tieres der Altersgruppe 13,5 Monate

Vergleichende Darstellung der meningealen β -Amyloid-Darstellung mittels Thioflavin-S-Fluoreszenzmikroskopie (A) und βA_{1-42} -Immunhistochemie (B).

Die Tatsache, dass die im Kortexparenchym lokalisierten fibrillären β -Amyloid-Ablagerungen in den Gehirnen der vier Wochen zuvor BDV-infizierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell abnahmen, das in den Gefäßwänden lokalisierte β -Amyloid-Material bei diesen Tieren jedoch gleichzeitig zunahm, lässt auf eine Umverteilung des Thio-S-positiven Amyloid-Materials bei den BDV-Tieren aus dem Kortexparenchym in die Gefäßwände schließen. Möglicherweise liegt diesem Umverteilungs-Prozess bei den BDV-infizierten Mäusen einer von mehreren potentiellen β -Amyloid-Clearance-Mechanismen zugrunde (siehe 5.2.2), bei dem β -Amyloid – wahrscheinlich nach Aufnahme durch die aktivierten Mikrogliazellen – über vaskuläre Systeme abtransportiert wird, wobei sich β -Amyloid teilweise oder vollständig in den Wänden dieser abtransportierenden Blutgefäße einlagern könnte. Ein solcher Mechanismus wurde bereits 1992 von FRAUTSCHY et al. beschrieben (siehe 5.2.2).

Diese Ergebnisse bestätigen eine Studie, die im Jahr 2001 von der Arbeitsgruppe um WYSS-CORAY (a) durchgeführt wurde. Diese Gruppe arbeitete mit doppelt transgenen hAPP / TGF- $\beta 1$ -Mäusen, die ab einem Alter von acht bis zehn Monaten kompakte β -Amyloid-Plaques entwickelten und zusätzlich das Zytokin TGF- $\beta 1$ überexprimierten, welches einen wichtigen Regulator inflammatorischer Reaktionen im Gehirn darstellt (FINCH et al. 1993). Als Kontrollmäuse dienten einfach transgene hAPP-Mäuse ohne TGF- $\beta 1$ -Überexpression. Es wurde ebenfalls die Anzahl Thioflavin-S-positiver, parenchymaler und vaskulärer β -Amyloid-Ablagerungen pro Hirnschnittebene in Altersgruppen von 12 bis 15 Lebensmonaten ausgewertet.

WYSS-CORAY et al. (2001) konnten zeigen, dass die TGF- $\beta 1$ -überexprimierenden Mäuse 65 bis 75 % weniger parenchymatöse, Thio-S-positive Plaques in ihren Gehirnen aufwiesen, als die hAPP-transgenen Kontrollmäuse.

Eine weitere Parallele dieser Studie zu unseren Ergebnissen stellt die von WYSS-CORAY et al. (2001) registrierte inverse Korrelation zwischen Thio-S-positiven, parenchymatösen und perivaskulären β -Amyloid-Ansammlungen dar. Während bei den hAPP-transgenen Kontrolltieren zahlreiche parenchymatöse Amyloid-Ablagerungen insbesondere im Bereich des Hippokampus zu finden waren, zeigten die TGF- $\beta 1$ -überexprimierenden Mäuse fast

ausschließlich in den Gefäßen der Meningen und der Fissura hippocampi lokalisiertes β -Amyloid-Material. Derartiges perivaskulär lokalisiertes β -Amyloid war bei den Kontrollmäusen kaum zu finden.

WYSS-CORAY et al. (2001) registrierten eine deutliche mikrogliale Aktivierung ausschließlich bei den TGF- β 1-überexprimierenden Mäusen, während die hAPP-transgenen Kontrollmäuse lediglich ruhende Mikrogliazellen aufwiesen. Auch dieser Befund entspricht unseren Ergebnissen, die ebenfalls eine Mikroglia-Aktivierung nur bei den BDV-infizierten Mäusen, nicht jedoch bei den nicht infizierten Kontrolltieren, aufzeigten.

Da TGF- β 1 eine mikrogliale Aktivierung in älteren hAPP / TGF- β 1-transgenen Mäusen induziert und eine mikrogliale β -Amyloid-Clearance *in vitro* vermittelt (YAO et al. 1990; WAHL et al. 1992; WYSS-CORAY et al. 1997), schlussfolgerte die Arbeitsgruppe um WYSS-CORAY (2001), dass für die TGF- β 1-bedingte Reduktion von β -Amyloid-Ablagerungen ebenfalls mikrogliale Clearance-Mechanismen, wie Phagozytose, proteolytische Degradation (QIU et al. 1998) und/oder zellgebundener Abtransport über das Gefäßsystem mit Einlagerung von β -Amyloid in die Gefäßwände, verantwortlich seien. Möglich wäre auch eine TGF- β 1-induzierte Sekretion von β -Amyloid-bindenden Proteinen, wie extrazelluläre Matrixproteine, die die mikrogliale Phagozytose von β -Amyloid und/oder die Einlagerung in Gefäßwände fördern und somit den Gehalt an parenchymatösen β A-Ablagerungen reduzieren.

Diese potentiellen Mechanismen können auf unsere Untersuchungen übertragen werden, da auch in unseren BDV-infizierten Mäusen der Altersgruppe 13,5 Monate im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren eine signifikant erhöhte TGF- β 1-Expression gefunden wurde (persönliche Mitteilung Dr. T. Stahl, Leipzig, 2007), die möglicherweise die registrierte Mikroglia-Aktivierung induzierte.

WILCOCK (a, b) und Mitarbeiter konnten 2004 durch intraperitoneale Verabreichung von Anti- β -Amyloid-Antikörpern in Tg2576-Mäuse ebenfalls sowohl eine Reduktion der parenchymalen β -Amyloid-Belastung um 90 % sowie einen deutlichen Anstieg des vaskulären β -Amyloid-Gehaltes verzeichnen. Im Gegensatz zu Kontrollmäusen zeigten auch in dieser Studie nur die behandelten Mäuse eine Mikroglia-Aktivierung, die insbesondere um die β -Amyloid-enthaltenden Gefäße zu finden war. Daher kommt auch die Arbeitsgruppe um WILCOCK (2004) zu der Schlussfolgerung, dass Mikrogliazellen eine wichtige Rolle in diesem Umverteilungs- und Reduktionsprozess des β -Amyloids spielen und erwägen, dass Mikrogliazellen mit dem durch den verabreichten Antikörper opsonierten β -Amyloid - entweder durch Phagozytose oder durch Oberflächenbindung über Rezeptoren oder Matrixproteine – assoziiert sind und so dieses Material zu den Gefäßen transportieren, um es aus dem Gehirn zu eliminieren.

Zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen zur β -Amyloid-Belastung in den Gehirnen von BDV-infizierten Tg2576-Mäusen und nicht infizierten Tg2576-Kontrollmäusen wurde eine quantitative, biochemische Untersuchung mittels Sandwich-ELISA durchgeführt. Um zwischen löslichem und fibrillärem Plaque-assoziiertem β -Amyloid₁₋₄₀ sowie β -Amyloid₁₋₄₂ zu differenzieren, wurde die von KAWARABAYASHI et al. (2001) beschriebene sequentielle Zwei-Schritt-Extraktion aus Hirnhomogenaten von transgenen Kontroll- und BDV-Tieren der Altersgruppen 11, 13,5 und 18 Monate durchgeführt.

Der von uns verwendete ELISA ist hochsensitiv und stellt daher besonders hohe Ansprüche an die Probenpräparation sowie an die Probenaufbereitung. Kritisch anzumerken ist die präparationsbedingte Ungenauigkeit bei der Gewinnung der Kortex- und Hippokampus-Proben, die nicht standardisiert erfolgte. Problematisch war außerdem das Alter der Mäuse aller drei Altersgruppen, da sowohl die löslichen als auch die fibrillären β -Amyloid-Fraktionen in diesem Zeitfenster besonders stark ansteigen, was zu hohen individuellen Unterschieden führt (APELT et al. 2004). Da der Konzentrationsbereich der verschiedenen β -Amyloid-Fraktionen nicht sicher abgeschätzt werden konnte und die Probenverdünnungen empirisch (ohne Vormessung) vorgenommen wurden, lagen die gemessenen Werte oft am Rande des linearen Standardbereichs. Des Weiteren wurden aus Kostengründen nur Einfach-Bestimmungen durchgeführt.

Aufgrund dieser potentiellen Fehlerquellen unter den gewählten Versuchsbedingungen sind die Ergebnisse aus den ELISA-Untersuchungen methodisch kritisch zu werten und erreichen daher nicht die Aussagekraft der histologisch ermittelten Ergebnisse.

Unter dieser Prämisse zeigten die Werte aus dem ELISA zumindest für die Altersgruppe 13,5 Monate annähernd dieselbe Tendenz wie die histologischen Ergebnisse: Die BDV-infizierten Mäuse dieser Altersgruppe zeigten überwiegend geringere Gehalte der löslichen und fibrillären Fraktionen des βA_{1-40} - und βA_{1-42} -Peptids als die nicht infizierten Kontrollmäuse (siehe Abb. 4.2.4.a, S. 73 und Tab. 4.2.4 in Anhang III, S. XXXVI bis XXXVII). Die ELISA-Werte aus den Altersgruppen 11 und 18 Monate zeigten keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und BDV-infizierten Tieren auf.

Eine Erklärung für die sehr uneinheitlichen Ergebnisse der ELISA-Auswertung, die nur teilweise mit den immunhistochemisch ermittelten Befunden übereinstimmten, liefert die Tatsache, dass der ELISA sämtliches β -Amyloid – also gelöste und abgelagerte (lösliche und fibrilläre) Fraktionen sowie auch möglicherweise in Zellen befindliche und gefäßwandständige Anteile – erfasst, während die Immunhistochemie nur abgelagertes lösliches und fibrilläres β -Amyloid detektiert, jedoch kein gelöstes und inkorporiertes – also an Zellen gebundenes – β -Amyloid, da dieses durch die Gewebssperfusion ausgespült wurde. Die histologisch nachgewiesene **Reduktion** des β -Amyloid-Gehaltes nach BDV-induzierter Mikroglia-Aktivierung wäre demnach eher als eine **Umverteilung** des β -Amyloid-Materials vom Parenchym in die Gefäße und deren Umgebung bzw. in oder an Mikrogliazellen – zum Transport oder zur Phagozytose – zu interpretieren.

Dass die histologisch erfassten Unterschiede für das lösliche und fibrilläre β -Amyloid zwischen Kontrolltieren und BDV-infizierten Tieren weitgehend nicht durch den ELISA bestätigt wurden, kann auch dadurch bedingt sein, dass durch die BDV-induzierte Entzündung vorrangig kleine, lösliche und fibrilläre Ablagerungen beseitigt wurden, die jedoch in der Volumensumme, die den ELISA-Werten durch die Erfassung des Gesamt β -Amyloids entspricht, nicht ins Gewicht fallen.

Das Borna Disease Virus führt – genauso wie in dem LPS-, dem TGF- β 1- oder dem β -Amyloid-Immunisierungsmodell – zu einer lokal umschriebenen Aktivierung von Mikrogliazellen mit nachfolgender zerebraler β -Amyloid-Reduktion in den Gehirnen infizierter Mäuse.

Je nach Alter und aktivierendem Stimulus gibt es verschiedene Phänotypen von aktivierten Mikrogliazellen, die unterschiedliche Oberflächen-Antigene exprimieren und daher auch nur

mit jeweils angepassten Markern zu differenzieren sind (MORGAN et al. 2005). Im Zusammenhang mit β -Amyloid wurden zwei mikrogliale Phänotypen beschrieben, die jeweils unterschiedliche Effekte auf das neuronale Umfeld haben; der Antigen-präsentierende Phänotyp und der Phagozyten-Phänotyp (TOWNSEND et al. 2005). Der Antigen-präsentierende Phänotyp tritt im Rahmen einer Immunantwort vom Th₁-Typ auf, die mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF α und IFN γ einhergeht und durch Inflammation, chronische Mikroglie, Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen, Stickoxiden, proteolytischen Enzymen, exzitatorischen Aminosäuren und damit verbundenem Zelltod gekennzeichnet ist. Der Phagozyten-Phänotyp ist mit einer Immunantwort vom Th₂-Typ assoziiert, bei dem es zur Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-10 und TGF- β 1 sowie zur erhöhten mikroglialen Phagozytose von β -Amyloid₁₋₄₂ (TOWNSEND et al. 2005) und Verhinderung der β -Amyloid-Plaques-Formation kommt (MORGAN et al. 2005). TGF- β 1 beispielsweise schützt Neuronen vor Glutamat- oder β -Amyloid-induzierter Neurotoxizität, möglicherweise durch Ankurbelung antiapoptotischer und Kalzium-stabilisierender Faktoren (FLANDERS et al. 1998). Synonyme Begriffe, die insbesondere für periphere Makrophagen verwendet werden, sind der „klassische Aktivierungstyp“, der dem Antigen-präsentierenden Phänotyp entspricht und der „alternative Aktivierungstyp“, der dem Phagozyten-Phänotyp entspricht (DUFFIELD et al. 2003; COLTON

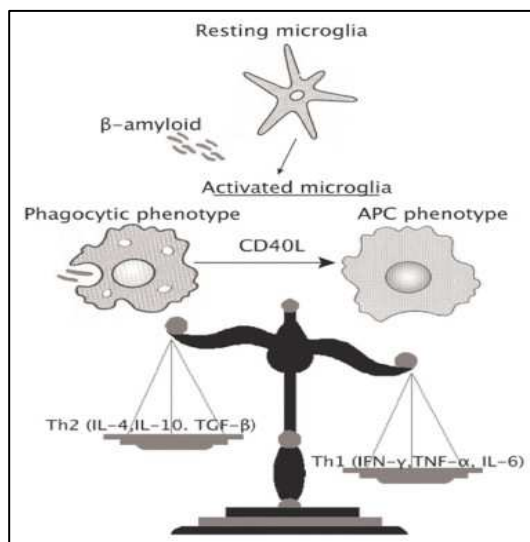


Abb. 5.2.1.b: Klassische (APC-Phänotyp) und alternative (Phagozyten-Phänotyp) Mikroglia-Aktivierung nach TOWN et al. 2005

APC = Antigen presenting cell; Antigen-präsentierender Phänotyp
CD₄₀L = CD₄₀-Ligand

et al. 2006). Die Induktionssignale für die Aktivierungstypen in den transgenen β A-Mausmodellen und in der humanen AD sind noch unklar. Wesentlich dafür, welcher mikrogliale Phänotyp bei der Aktivierung dominiert, ist jedoch der aktivierende Reiz sowie das neuronale Umfeld, insbesondere die vorhandenen Zytokinmuster; antiinflammatorische Zytokine der Th₂-Immunantwort, wie IL-4, IL-10 und TGF- β aktivieren den alternativen oder Phagozyten-Phänotyp, während proinflammatorische Zytokine der Th₁-Immunantwort, wie IFN γ , TNF- α , IL-6 den klassischen oder Antigen-präsentierenden Phänotyp aktivieren. Eine Transformation vom alternativen zum klassischen Aktivierungstyp ist beispielsweise nach Kostimulation mit CD₄₀-Liganden möglich (TOWN et al. 2005; siehe Abb. 5.2.1.b).

Signale, die die Transformation vom klassischen zum alternativen Aktivierungstyp induzieren, sind wahrscheinlich IL-4, IL-13 und weitere Th₂-Zytokine (GORDON 2003; COLTON et al. 2006). Eine solche Transformation vom klassischen zum alternativen Mikroglia-Aktivierungstyp wird auch für die Alzheimer-Pathologie angenommen. Da β -Amyloid mit zahlreichen mikroglialen Membranrezeptoren, wie Scavenger-Rezeptoren A und B, CD₄₀, einem $\alpha_6\beta_1$ -Integrin/CD₃₆/CD₄₇-Komplex und Komplementrezeptoren (EL KHOURY et al. 1996; CALINGASAN et al. 2002; BAMBERGER et al. 2003; RICCIARELLI et al. 2004; TOWNSEND et al. 2005) interagiert, induziert es möglicherweise selbst diese Transformation (COLTON et al. 2006). In unserem Modell ist die Mikroglia-Aktivierung nach BDV-Infektion mit dem von uns

verwendeten F4/80-Marker nicht eindeutig einem dieser Aktivitätstypen zuzuordnen. Wahrscheinlich kommt es eher zu einer gemischten Aktivierung sowohl von klassischem als auch alternativem Aktivierungstyp, da sowohl Th₁- als auch Th₂-Zytokine vermehrt exprimiert wurden (siehe 5.1.1.1): Die Th₂-Zytokine TGF- β und IL-10, die auch in unseren Mäusen vermehrt exprimiert wurden, bewirken eine verstärkte mikrogliale Aufnahme von fibrillärem β -Amyloid (KOENIGSKNECHT-TALBOO & LANDRETH 2005), was dem alternativen Aktivierungstyp entspricht, jedoch war die Expression der Th₁-Zytokine IFN- γ , IL-1 β und IL-6 in unseren Mäusen nach BDV-Infektion ebenfalls erhöht, was eine klassische Mikroglia-Aktivierung induziert. Für unser Modell ist daher eine bisher noch nicht explizit charakterisierte, heterogene Vorläufer- oder Zwischenform dieser mikroglialen Aktivitäts-Typen – wie von COLTON und Mitarbeitern (2006) beschrieben - anzunehmen, ähnlich der von ANDERSON & MOSSER (2002) beschriebenen sogenannten Typ-II-Makrophagen, die als „Hybrid-Aktivitätstyp“ Charakteristika sowohl des klassischen als auch des alternativen Aktivitätstyps in sich vereint (GORDON 2003; MOSSER 2003).

Unser Modell stützt die positive Korrelation von lokaler Mikroglia-Aktivierung und β -Amyloid-Reduktion und stellt daher eine wertvolle Ergänzung zu den in MORGAN et al. (2005) zusammengestellten Modellen zur Mikroglia-Aktivierung und deren Folgen dar. Ein Vorteil unseres BDV-Modells ist die zeitliche Differenz von vier Wochen zwischen Eingriff (BDV-Infektion) und Untersuchung, da die durch den intrazerebralen Injektionsreiz induzierten Irritationen zum Untersuchungszeitpunkt abgeklungen waren, und die BDV-spezifische inflammatorische Reaktion deutlichste Ausprägung zeigte. Da die Mikroglia-Aktivierung in diesem Modell, im Gegensatz zu den β A-Immunisierungsstudien, nicht β A-spezifisch ist, unterstreicht sie die Rolle angeborener Abwehrprozesse, insbesondere im Hinblick auf die teilweise gravierenden bystander-Effekte von spezifischer Aktivierung, wie beispielsweise das Auftreten von schweren aseptischen Meningoenzephalitiden mehrerer Patienten im Rahmen einer passiven Vakzinierungsstudie (IMBIMBO 2002).

Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten auf die komplexe Interaktion von infektiösen Enzephalitiden und degenerativen Veränderungen hin; sie zeigen, dass zentralnervöse Infektionen negative oder positive Auswirkungen auf die Pathogenese der AD haben können und somit Risikofaktoren für die Alzheimersche Krankheit darstellen. Diese komplexe Interaktion ist gleichzeitig der Nachteil unseres BDV-Modells, da einzelne Wirkmechanismen schwer zu differenzieren sind.

5.2.2 Mögliche Mechanismen der β -Amyloid-Reduktion unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Mikroglia

Zahlreiche Studien belegen die Rolle der Mikroglia bei β -Amyloid-Reduktion (DICARLO et al. 2001; LIM et al. 2001; WEBSTER et al. 2001; WILCOCK et al. 2001, 2003; WYSS-CORAY et al. 2001a, 2002; JANTZEN et al. 2002; D'ANDREA et al. 2004). Unsere Untersuchungen weisen auf potentielle β -Amyloid-Clearance-Mechanismen hin, die an dieser Stelle diskutiert werden sollen. Diese Mechanismen, über die eine β -Amyloid-Reduktion bewerkstelligt wird, sind auch für die Modelle von DICARLO, WYSS-CORAY und WILCOCK noch nicht geklärt. Aufgrund der spezifisch auftretenden Mikroglia-Aktivierung bei allen drei Modellen (LPS, TGF-

$\beta 1$, Anti- β -Amyloid-Antikörper) und bei BDV-behandelten Tieren ist eine Beteiligung mikroglialer Clearance-Mechanismen an der β A-Reduktion sehr wahrscheinlich.

Neben den hier beschriebenen Modellstudien wurde in der Vergangenheit eine große Anzahl weiterer Untersuchungen durchgeführt, die durch ganz unterschiedliche, natürliche oder synthetische Faktoren – wie β -Amyloid-Fragmente (MENTLEIN et al. 1998; SCHENK et al. 1999; MORGAN et al. 2000), anti- β -Amyloid-Antikörper (BARD et al. 2000, 2003; JANUS et al. 2000; BACSKAI et al. 2001, 2002; DEMATTOS et al. 2001; KOTILINEK et al. 2002), Komplement-Komponenten (WYSS-CORAY et al. 2002), Curcumin (LIM et al. 2001), Indomethacin (QUINN et al. 2003), entorhinale Kortex-Läsionen (CHEN et al. 1998) – eine gezielte Aktivierung von Komponenten des Immunsystems im ZNS, insbesondere der Mikrogliazellen, mit anschließender β -Amyloid-Clearance erzielen konnten.

Mikrogliazellen sind in der Lage, β -Amyloid durch drei verschiedene Clearance-Mechanismen zu degradieren, die von den jeweiligen Arbeitsgruppen belegt werden konnten und die im Folgenden auf der Grundlage unserer Ergebnisse diskutiert werden:

- 1) Abtransport über das Gefäßsystem nach Aufnahme von APP oder β -Amyloid durch Mikrogliazellen oder nach Bindung an exogene oder endogene, β -Amyloid-spezifische Antikörper unabhängig von Peptidasen (FRAUTSCHY et al. 1992; PODUSLO et al. 1997; DEMATTOS et al. 2001, 2002; WILCOCK et al. 2003, 2004a, b, c).
- 2) Proteolyse von APP oder β -Amyloid durch extrazelluläre Peptidasen mikroglialen Ursprungs (FRACKOWIAK et al. 1992; MENTLEIN et al. 1998; YAN et al. 1999).
- 3) Rezeptor-vermittelte Endozytose von APP oder β -Amyloid und anschließende endosomal-lysosomale Proteolyse innerhalb der Mikrogliazelle (ARD et al. 1996; EL KHOURY et al. 1996; PARESCIE et al. 1996; BARD et al. 2000; D'ANDREA et al. 2004; KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004; KOENIGSKNECHT-TALBOO & LANDRETH 2005).

Bereits 1992 zeigten FRAUTSCHY et al. *in vivo*, dass phagozytotische Mikrogliazellen exogenes Amyloid internalisieren können. In ihrer Studie beschrieben sie, dass ein Teil der β -Amyloid-enthaltenen Mikrogliazellen zu Gefäßen migrierte, um das Amyloid aus dem Gehirn zu entfernen. Vier Wochen nach der von ihnen durchgeführten Injektion von humanen Amyloidkernen in den Kortex und Hippokampus von Ratten war ein Großteil des Amyloids direkt mit Blutgefäßen assoziiert.

Ein ganz ähnlicher Befund wurde in dieser Arbeit in den Gehirnen der BDV-infizierten Mäuse aller drei Altersgruppen durch die Thioflavin-S-Markierung erhoben; im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren wiesen die BDV-Tiere höhere Gehalte an perivaskulär lokalisiertem β -Amyloid auf (siehe Abb. 4.2.3.1.e, S. 71 und Tab. und Abb. 4.2.3.1.la, IIb und IIIb in Anhang III, S. XXXI, XXXIII und XXXV).

Wie von FRAUTSCHY und Mitarbeitern (1992) geschlussfolgert, könnte es sich bei diesem perivaskulären β -Amyloid um in Mikroglia inkorporiertes Amyloid handeln, dass von ihnen über die zerebralen Blutgefäße aus dem Gehirn entfernt wird. Diese Arbeitsgruppe konnte belegen, dass β -Amyloid von Mikroglia phagozytiert und anschließend mehrere Millimeter zu den Gefäßen transportiert wird, denn sie fanden mittels ultrastruktureller Analysen β -Amyloid-

enthaltende Mikrogliazellen im Lumen der Gefäße. Möglicherweise entstammte daher auch das in unseren Untersuchungen gefundene perivaskuläre und vaskuläre β -Amyloid-Material - Plaques, die nach Proteolyse in fragmentierter Form an Mikroglia gebunden oder inkorporiert und abtransportiert wurden. Diese lösten sich beim Transport durch das zerebrale Endothel exozytotisch von ihrem „mikroglialen Shuttle“ und lagerten sich anschließend in oder an die Gefäßwände. Solche Mechanismen sind hypothetisch auch von anderen Arbeitsgruppen schon lange beschrieben (WISNIEWSKI & TERRY 1973; FRAUTSCHY et al. 1992).

Polare Substanzen, wie auch β -Amyloid-Peptide, können die Blut-Hirn-Schranke in der Regel aufgrund der kontinuierlichen endothelialen Zellschicht, die tight-junctions als Zell-Zell-Verbindungen aufweist, nicht passieren (BEGLEY & BRIGHTMAN 2003). ZLOKOVICH (2004) nimmt daher an, dass spezialisierte Transporter für β -Amyloid im Endothelium der Blut-Hirn-Schranke für die Transzytose des Peptids aus dem Gehirn in das Gefäßsystem existieren. Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen, dass lösliche β -Amyloid-Peptide auch unabhängig von zellulären Shuttle-Systemen die Blut-Hirn-Schranke überqueren können und anschließend peripher degradiert werden (PODUSLO et al. 1997; DEMATTOS et al. 2001, 2002).

Die Tatsachen, dass in unseren Untersuchungen nicht infizierte Kontrolltiere aller Altersgruppen, die keine Mikroglia-Aktivierung entwickelten, kaum Amyloid-Bestandteile in den zerebralen Gefäßen aufwiesen, und dass parenchymatöse β -Amyloid-Reduktion mit perivaskulärer Ablagerung einherging, sprechen allerdings dafür, dass Mikroglia an dieser β -Amyloid-Reduktion im Sinne eines Mikroglia-vermittelten Amyloid-Abtransports aus dem Gehirn über das Gefäßsystem maßgeblich beteiligt sind. Entsprechend der Mikroglia-Markierung in unmittelbarer Nähe der Plaques wurden mit dem von uns verwendeten Marker F4/80 nur vereinzelt aktivierte Mikrogliazellen in der Umgebung der zerebralen Gefäße gefunden. Allerdings fanden WILCOCK (a) und Mitarbeiter (2004) verstärkt perivaskulär lokalisierte Mikroglia mit erhöhter CD₄₅-Expression in passiv β A-immunisierten Tg2576-Mäusen mit perivaskulären β -Amyloid-Ablagerungen, was die Hypothese stützt, dass für die β A-Reduktion bzw. -Umverteilung aktivierte Mikroglia-Zellen verantwortlich sind, die mit durch Antikörper opsoniertem β -Amyloid-Material assoziiert sind. Die so aktivierten Mikrogliazellen binden dieses Material beispielsweise durch Rezeptoren oder andere Oberflächenproteine oder nehmen größere β A-Fraktionen endozytotisch auf, um es anschließend an oder im Gefäßsystem freizusetzen (WISNIEWSKI & TERRY 1973), wo es zur weiteren Degradation oder zur Antigen-Präsentation in die Peripherie transportiert wird.

Derartige Clearance von β -Amyloid über die Blut-Hirn-Schranke wurde zusammenfassend von ZLOKOVIC (2004) belegt. Ist das β -Amyloid-Material an die Blut-Hirn-Schranke gelangt, müssen hier weitere Clearance-Mechanismen vorhanden sein (SHIBATA et al. 2000). Beispielsweise induziert TGF- β 1 eine, von aktivierten perivaskulären Astrozyten ausgehende, vermehrte Produktion und Akkumulation von Membranproteinen (WYSS-CORAY et al. 1995, 2001a). Dieser erhöhte Gehalt an extrazellulären Matrixproteinen im Endothel erhöht die Affinität von β -Amyloid zum Gefäßsystem (KISILEVSKY 1994) durch Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane, die sowohl im β -Amyloid-Material als auch im Endothel enthalten sind (NARINDRASORASAK et al. 1990), und fördert daher die vaskuläre und perivaskuläre β A-Ablagerung (WYSS-CORAY et al. 2001a). Daneben gibt es zahlreiche β A-bindende Rezeptoren auf den Endothelzellen, die die endotheliale Endozytose und Transzytose von β -Amyloid an der Blut-Hirn-Schranke regulieren, wie beispielsweise RAGE

(YAN et al. 1996; MACKIC et al. 1998), SR-A (Scavenger-Rezeptor Typ A) (PARESCE et al. 1996), LRP-1 (LDL receptor-related protein-1) (NARITA et al. 1997; QIU et al. 1999) und LRP-2 (LDL receptor-related protein-2) (ZLOKOVIC 1996).

Des Weiteren sind regulierende Faktoren beschrieben, die den β -Amyloid-Efflux aus dem Gehirn ins Gefäßsystem via Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke kontrollieren, wie Low-density lipoprotein receptor-related Protein 1 (LRP-1) und seine Liganden α_2 -Makroglobulin (α_2 M) und apoE; LRP-1 scheint ein essentieller Faktor für den β A-Transport über die Blut-Hirn-Schranke zu sein, da anti-LRP-1-Antikörper die β A-Clearance um 55 % reduzierten (SHIBATA et al. 2000). Freies β -Amyloid wird nicht an LRP-1 gebunden; erst nach Assoziation mit α_2 M oder apoE, die β -Amyloid mit hoher Affinität binden (DU et al. 1997; TOKUDA et al. 2000; HERZ 2003), wird es zu einem Liganden des transendothelialen Transports vermittelnden LRP-1 (SHIBATA et al. 2000).

Nach β A-Immunisierungen können auch Antikörper eine β A-Reduktion durch Aktivierung von Mikroglia zur Phagozytose von löslichem oder fibrillärem β -Amyloid via Fc- oder Komplementrezeptoren bewirken (DAS et al. 2001; DAS & GOLDE 2002). BACSKAI und Mitarbeiter (2002) beschrieben jedoch *in vivo*, dass für eine solche anti- β -Amyloid-Antikörper-vermittelte Reduktion der β -Amyloid-Ablagerungen lediglich die F(ab')₂-Fragmente des Antikörpers verantwortlich wären. Allerdings waren in einer weiteren Studie F(ab')₂-Fragmente von anti- β -Amyloid-Antikörpern nicht in der Lage, Mikroglia zu aktivieren. Des Weiteren zeigten diese Fragmente eine sehr viel geringere Clearance-Rate von fibrillärem β -Amyloid, als das komplette anti- β -Amyloid-IgG (WILCOCK et al. 2004a).

WILCOCKs Ergebnisse weisen darauf hin, dass insbesondere für die Reduktion von fibrillären β -Amyloid-Ablagerungen mikroglial-basierte Mechanismen greifen, sodass eine Mikroglia-Aktivierung mit Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose-Prozessen für eine Clearance von kompakten Amyloid-Ablagerungen – beispielsweise im Rahmen einer Immuntherapie – essentiell sind.

Neben diesen Mechanismen ist die Ausschüttung von $A\beta$ -abbauenden, proteolytischen Enzymen durch Mikroglia, wie Insulin-Degrading Enzyme und zahlreichen Metalloproteasen (siehe Literaturübersicht 2.1.3.2) ein weiterer potentieller kataboler Mechanismus (QIU et al. 1998). In einer *in vitro*-Studie im Jahr 1998 wurde eine Clearance von β -Amyloid durch eine von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzte Metalloprotease registriert. Ausschließlich **aktivierte** Mikrogliazellen, nicht jedoch ruhende Mikroglia oder Astrozyten waren zu dieser proteolytischen β -Amyloid-Clearance befähigt (MENTLEIN et al. 1998). Da auch in unserem BDV-Modell Mikrogliazellen aktiviert wurden, könnte die β A-Reduktion hier auch durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme erreicht worden sein. Da wir jedoch keine Untersuchungen zur proteolytischen β A-Degradation durchgeführt haben, ist diese Annahme rein spekulativ.

Wahrscheinlich liegt eine Kombination verschiedener β A-Clearance-Mechanismen vor, bei denen beispielsweise zunächst eine Degradation von β -Amyloid-Ablagerungen durch mikrogliale Proteasen erfolgen würde; die verbleibenden β A-Spaltprodukte könnten möglicherweise leichter phagozytiert, transportiert oder durch Antikörper gebunden werden. Des Weiteren sind sie nicht neurotoxisch und weisen kein Aggregationspotential auf

(MUKHERJEE et al. 2000). Weitere β A-degradierende Proteasen wurden von SELKOE (2001b) zusammengefasst.

Ein weiterer, wahrscheinlich der wichtigste Mechanismus, ist die Endozytose von APP oder β -Amyloid und anschließende endosomal-lysosomale Proteolyse innerhalb der Mikrogliazelle. Diese Phagozytose-Funktion von in und um β -Amyloid-lokalisierten Mikrogliazellen ist auch auf ultrastruktureller Ebene schon lange beschrieben (TERRY et al. 1964; FRAUTSCHY et al. 1992). Wie in der Literaturübersicht (2.1.3.2) beschrieben, wird die mikrogliale β A-Phagozytose durch klassische Phagozytose-Rezeptoren, wie Fc- und Komplementrezeptoren, sowie durch Zelloberflächenrezeptor-Komplexe vermittelt (KOENIGSKNECHT & LANDRETH 2004); anschließend erfolgt eine intrazelluläre, teilweise oder vollständige Lyse des phagozytierten Materials, beispielsweise durch toxische Sauerstoffradikale (respiratory burst). VON BERNHARDI & RAMIREZ (2001) konnten *in vitro* belegen, dass Mikrogliazellen große Mengen APP und β -Amyloid phagozytieren und intrazellulär abbauen können. Extrazelluläre Proteasen konnten von dieser Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden. VON BERNHARDI & RAMIREZ schlussfolgerten, dass ein Fehler in diesem mikroglialen Phagozytosesystem die Entzündungskaskade aufgrund der intrazellulären β -Amyloid-Akkumulation ankurbelt.

Auch die Arbeitsgruppe um ROGERS (2002) zeigte, dass Mikroglia *in vitro* nicht nur zu aggregierten Amyloid-Ablagerungen migrieren, sondern sie auch tatsächlich innerhalb von zwei bis vier Wochen effektiv entfernen. Die Phagozytose-vermittelten Clearance-Prozesse sind abhängig vom Komplement-System (siehe Abb. 5.2.2.c), welches auch durch BDV aktiviert wird (DIETZSCHOLD et al. 1995); wenn dieses nicht oder nur unzureichend funktioniert, sind sowohl Mikroglia-Aktivierung als auch β -Amyloid-Reduktion herabgesetzt (WYSS-CORAY et al. 2002).

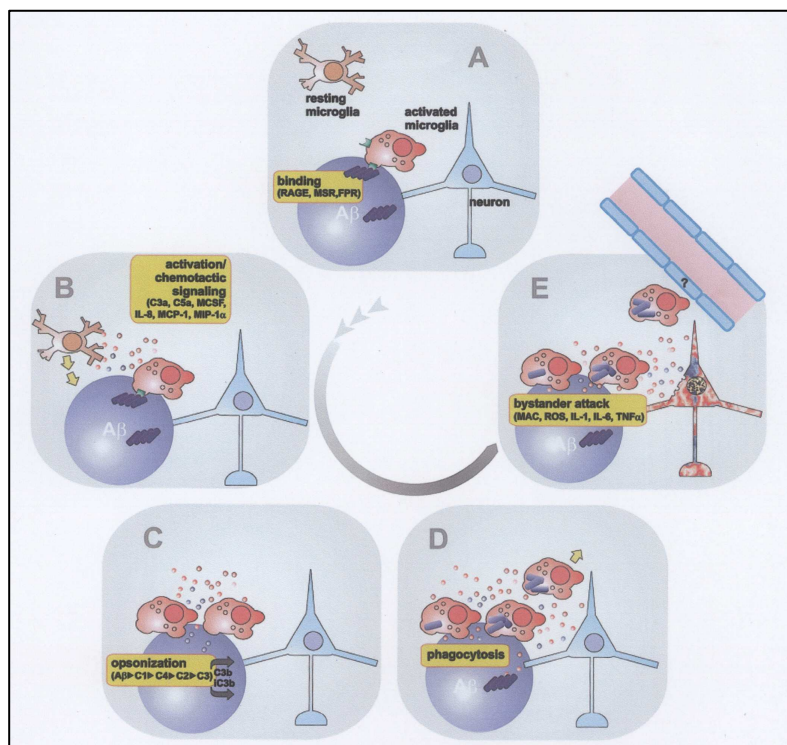


Abb. 5.2.2.c: Mikrogliale Reaktionsmechanismen auf β A-Ablagerungen (nach ROGERS et al. 2002):

- A:** Bindung und Aktivierung.
- B:** Sekretion von chemotaktischen und aktivierenden Stimuli.
- C:** Aktivierung des Komplementsystems und Opsonierung.
- D:** Phagozytose.
- E:** Sekundäre Schädigung benachbarter Neuronen und Neuriten.

Legende: RAGE: receptor for advanced glycation end products, MSR: Makrophagen Scavenger Receptor, FPR: Formylpeptid-Rezeptor, MAC: Membrane attack complex, ROS: reactive oxygen species, MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α , MCP-1: Monocyte chemoattractant peptide -1, MCSF: Macrophage-colony-stimulating factor

Ein rein phagozytotisch bewerkstelligter β -Amyloid-Abbau scheint in unserem Modell nicht zutreffend zu sein, denn die fluoreszenzmikroskopischen Doppelmarkierungs-Analysen zeigten zwar zahlreiche aktivierte Mikrogliazellen in BDV-infizierten Mäusegehirnen, die sich jedoch nicht verstärkt um fibrilläre Amyloid-Ablagerungen aufhielten und auch nur partiell mit diesen Amyloid-Ablagerungen zu interagieren schienen (siehe Abb.4.2.3.2.a B und C, S. 72). Die Phagozytose von diffusen β -Amyloid-Ablagerungen durch aktivierte Mikroglia in diesem Modell kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die bei diesen Analysen angewandte Thioflavin-S-Färbung nur fibrilläre Plaques markiert. Eine sich dieser Färbung entziehende Interaktion zwischen diffusen, jüngeren Amyloid-Ablagerungen und aktivierten Mikrogliazellen ist daher möglich. Außerdem traten phagozytotische Mikroglia-Formen nach BDV-Infektion auf (siehe Abb. 4.2.1.1.h C und D, S. 60).

Die registrierte lokale Diskrepanz zwischen β -Amyloid-Reduktionsgrad und Mikroglia-Aktivierungsgrad (siehe Tab. 4.2.2.a, S. 67) steht scheinbar im Widerspruch zu der Hypothese, dass Mikroglia die β A-Reduktion mittels Phagozytose bewerkstelligen. Dies unterstreicht die Schlussfolgerung, dass die β A-Reduktion nicht allein durch Phagozytose, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel aller hier diskutierten Clearance-Mechanismen erreicht wird. Kritisch anzumerken ist allerdings, dass die Klassifizierung von β A-Reduktionsgrad und Mikroglia-Aktivierungsgrad subjektiv, in Abhängigkeit von der Werteverteilung bzw. von morphologischen Kriterien vorgenommen wurde, was eine Fehlerquelle im anschließend durchgeführten Korrelations-Test darstellen könnte. Des Weiteren hätte man für exakte Korrelationsstudien dieser beiden Parameter den β A-Gehalt sowie den Mikroglia-Aktivierungszustand ein und desselben Tieres vor und nach der BDV-Infektion erfassen und miteinander vergleichen müssen, um potentiell unterschiedliche Ausgangssituationen und individuelle Unterschiede ausschließen zu können, was aber methodisch nicht möglich war. Diese methodischen Faktoren relativieren die Aussagekraft der von uns beobachteten lokalen Diskrepanz zwischen β A-Reduktions- und Mikroglia-Aktivierungsgrad.

Es gibt auch Mikroglia-unabhängige β A-Clearance-Prozesse, die insbesondere bei der früh einsetzenden Beseitigung von diffusem β -Amyloid nach passiven Immunisierungen beschrieben wurden (WILCOCK et al. 2003). Effektive Clearance sowohl diffuser als auch kompakter β A-Ablagerungen nach intrakranialer Injektion von deglykosyliertem, C-terminal-spezifischem Antikörper ohne mikrogliale Aktivierung konnte auch von der Arbeitsgruppe um CARTY (2006) gezeigt werden. Ein weiterer Mikroglia-unabhängiger Mechanismus wurde *in vitro* durch eine physikalische Interaktion zwischen anti- β -Amyloid-Antikörper und β -Amyloid mit anschließender Auflösung der β -Amyloid-Ablagerungen beschrieben (SOLOMON 2001). Die Arbeitsgruppe um DAS (2001) beschreibt zusammenfassend folgende Strategien, mit denen Antikörper nach β A-Immunisierungen die β A-Reduktion ohne mikrogliale Beteiligung bewirken:

- Bindung an lösliche β A-Fraktionen und Verhinderung ihrer Formation bzw. Akkumulation zu Plaques.
- Verschiebung des β A-Gleichgewichts zwischen Parenchym und Plasma durch Bindung von β A-Fraktionen im Plasma mit anschließendem β A-Efflux aus dem Gehirnparenchym ins Gefäßsystem („peripheral sink“) (DEMATOS et al. 2001, 2002).

- Unterbrechung bereits bestehender β A-Fibrillen und aggregierter β A-Ablagerungen beispielsweise durch Destabilisierung der β -Faltblatt-Konformation (sogenannte „ β -Sheet-Breaker“).

Allerdings wird die Clearance von fibrillärem β -Amyloid erleichtert und beschleunigt, wenn eine Aktivierung von Mikrogliazellen vorliegt (MORGAN et al. 2005). Dies bestätigt auch eine Studie von WILCOCK und Mitarbeitern (2003), in der nach passiver β A-Reduktion zwar eine Reduktion diffuser β A-Ablagerungen ohne mikrogliale Aktivierung beobachtet wurde, für die später einsetzende Reduktion fibrillärer β A-Plaques jedoch eine Aktivierung von Mikroglia erforderlich war.

Die Astroglia reagierte – mit Ausnahme von einigen BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate – in keiner Weise auf die BDV-Infektion bzw. auf die BDV-spezifische Lymphozyten-Infiltration. Die Astrozyten zeigten keine histologisch fassbaren Unterschiede zwischen BDV- und Kontrolltieren (siehe Abb. 4.2.1.1.g, S. 59).

Ob bzw. welche Rolle Astrozyten in der Amyloid-Clearance spielen ist noch völlig ungeklärt. Möglicherweise besteht die Aufgabe der Astroglia darin, die phagozytotische Aktivität der Mikrogliazellen zu regulieren (STOLL & JANDER 1999; D'ANDREA et al. 2001; SCHUBERT et al. 2001).

Während SHAFFER et al. (1995) und DEWITT et al. (1998) zeigten, dass Astrozyten die mikrogliale Phagozytose von senilen Plaques limitieren, indem sie die Plaques durch Proteoglykan-Ablagerung einer mikroglialen Attacke entziehen, somit die Clearance unterdrücken und die Ablagerung der Plaques ermöglichen, konstatierten WYSS-CORAY und Mitarbeiter (2003) eine direkte Rolle von Astrozyten im Abbau von β -Amyloid; diese Arbeitsgruppe zeigte, dass Astrozyten $A\beta_{1-42}$ binden und abbauen. In diesen Studien wurde jedoch immer eine deutliche Aktivierung der Astroglia registriert; diese Aktivierung ist die Voraussetzung für jegliche Art von Aktionen, wie beispielsweise Degradations-Funktionen.

Die fehlende astrogliale Reaktion nach BDV-Infektion spricht nicht für eine wesentliche Funktion dieser Gliazelle bei der β -Amyloid-Clearance in unserem Modell. Mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung von β A-Plaques und Astroglia wurden lediglich vereinzelt Astrozyten unabhängig von der BDV-Infektion - ausschließlich in unmittelbarer Plaque-Nähe - gefunden, die morphologische Kriterien einer Aktivierung aufwiesen (siehe Abb. 4.2.3.2.b, S. 72). MENTLEIN und Mitarbeiter (1998) konnten in einer *in vitro*-Studie ebenfalls keine β -Amyloid-Degradation durch Astrozyten, dafür aber eine deutliche β -Amyloid-Clearance durch aktivierte Mikrogliazellen feststellen. In neuropathologischen Untersuchungen an Alzheimer-Patienten spielten die Astrozyten ebenfalls keine Rolle bei der Phagozytose von β A-Plaques (NICOLL et al. 2006).

5.3 Ableitungen für potentielle therapeutische Strategien

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Charakterisierung spezifischer inflammatorischer und immunvermittelter Reaktionen im Alzheimer-Geschehen. Wie beschrieben, existiert bisher eine Fülle von Studien, die belegen, dass sich bestimmte Teilaspekte der inflammatorischen Antwort förderlich auf die Beseitigung des für die Alzheimer-Pathologie primär verantwortlichen β -Amyloid-Materials auswirken.

Vor dem Hintergrund dieser neueren Erkenntnisse scheint eine Total-Suppression der Entzündungskaskade mittels nicht selektiver NSAIDs zur alleinigen Prophylaxe oder Therapie der Alzheimerschen Erkrankung obsolet zu sein. Eine Hemmung der Komplement-Komponente C3 beispielsweise führte in einem Mausmodell zu einer Zunahme an β -Amyloid-Ablagerungen sowie zu einer verstärkten Neurodegeneration (WYSS-CORAY et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Teilaspekte der Komplement-Kaskade der Amyloid-Akkumulation sowie der Neurodegeneration – vermutlich via Komplement-Rezeptoren auf phagozytotisch aktiven Mikrogliazellen – entgegenwirken.

Insbesondere die Aktivierung von Mikroglia stellt sich im AD-Prozess als ein „zweischneidiges Schwert“ dar, da sie sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Auswirkungen besitzt. Insbesondere von einer überschießenden, chronischen mikroglialen Aktivierung gehen die bekannten neurotoxischen und neurodegenerativen Effekte aus.

Zahlreiche oben aufgeführte Studien – einschließlich der vorliegenden Arbeit – belegen allerdings in großer Methoden-Variabilität die eindeutig protektiven Fähigkeiten aktivierter Mikrogliazellen, die sich im Hinblick auf die AD insbesondere durch eine phagozytotische und proteolytische β -Amyloid-Clearance manifestieren.

Experimente mit APP-transgenen Tieren, in denen eine mikrogliale Aktivierung mutationsbedingt genetisch unterdrückt wurde (RAIVICH et al. 1994), deuteten eine Zunahme des β -Amyloid-Gehalts trotz – oder wegen – der ausbleibenden Mikroglia-Aktivierung an, sodass sie die These stützen, dass aktivierte Mikroglia an der physiologischen Amyloid-Clearance beteiligt sind. (Unveröffentlichte Ergebnisse; entnommen aus D`ANDREA et al. 2004). Eine generelle Unterdrückung ihrer Funktionen würde zwar der lokalen Inflammation Einhalt gebieten, hätte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die primären Ursachen der Amyloid-Plaquesformation und könnte sogar zu einer verstärkten β -Amyloid-Akkumulation führen (D`ANDREA et al. 2004).

Auch die sehr erfolgversprechenden immunotherapeutischen Strategien mittels aktiver oder passiver Vakzinierung basieren auf einer Reduktion der zerebralen β -Amyloid-Belastung durch Mikroglia-vermittelte Phagozytose, wobei die Vorteile einer passiven Immunisierung – insbesondere im Hinblick auf die im Zusammenhang mit aktiven Vakzinierungsstudien aufgetretenen Meningoenzephalitis-Zwischenfälle – aufgrund der guten Regulierbarkeit in Betracht zu ziehen wären.

Eine zukünftige pharmakotherapeutische Perspektive stellt daher die Etablierung verbesserter NSAIDs dar, die einerseits chronischen, neurotoxischen Entzündungsvorgängen entgegenwirken ohne förderliche Fraktionen wie einzelne Komplement-Komponenten zu hemmen, andererseits jedoch hochselektiv ausschließlich die inadäquaten, überschießenden und autotoxischen Effekte aktivierter Mikrogliazellen ausschalten, während die protektiven, phagozytotischen und proteolytischen Funktionen dieser Zellen intakt bleiben bzw. selektiv gefördert werden. Eine gute Ausgangssubstanz würde beispielsweise das Nitro-NSAID Flurbiprofen „NCX-2216“ darstellen, da für dieses die Fähigkeit zur mikroglialen Aktivierung mit anschließender, extrem potenter β -Amyloid-Reduktion beschrieben wurde (JANTZEN et al. 2002). Eine kombinierte Therapie-Strategie aus aktiver oder passiver Immunisierung und einem nach obigen Kriterien entwickeltem, selektiven NSAID-Präparat, dass chronische Aktivierungs- und Entzündungsprozesse dämpft, scheint ebenfalls sinnvoll.

Um die inflammatorisch-zytotoxischen Effekte, die trotz einer selektiven Mikroglia-Aktivierung auftreten könnten, zu neutralisieren, kann zusätzlich zu den oben beschriebenen Strategien eine gleichzeitige Behandlung mit Antikörpern oder löslichen Rezeptoren gegen proinflammatorische Zytokine – ähnlich der anti-TNF- α -Antikörper-Therapie bei rheumatoider Arthritis (BARRERA et al. 2001), Morbus Crohn (URRA et al. 2001) oder dem Sjögren-Syndrom (STEINFELD et al. 2001) – in Betracht gezogen werden. Auch eine gleichzeitige Behandlung mit Antioxidantien oder weiteren protektiven Agenzien kann in dieser teils entzündungshemmenden, teils immunstimulierenden Therapie-Strategie angezeigt sein. Eine Verschiebung von proinflammatorischer zu antiinflammatorischer, Th₂-vermittelter Zytokin-Produktion mit positiven Auswirkungen auf Mikroglia-Aktivierung und β -Amyloid-Clearance kann möglicherweise durch eine mukosale Immunisierung mit intranasaler Applikation von β -Amyloid-Peptiden erreicht werden (WEINER et al. 2000; HOCK et al. 2003; MONSONEGO & WEINER 2003; NICOLL et al. 2003).

Da viele Aspekte der Immunreaktion positive Auswirkungen auf den AD-Verlauf haben, wird durch diese Untersuchung gestützt, dass ein regulierendes, instruierendes Einwirken auf die Inflammations-assoziierten Prozesse im Gehirn – möglicherweise im Zusammenhang mit einer protektiven Begleit-Therapie – eine effektivere therapeutische Strategie darstellt, als ein totales, nicht selektives Ausschalten dieser Prozesse.

6 Zusammenfassung

Christine Reimers

Die Beeinflussung der β -Amyloid-Belastung in einem transgenen Mausmodell des Morbus Alzheimer durch Borna-Disease-Virus (BDV)-induzierte Inflammation

Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Eingereicht im Dezember 2007

104 Seiten, 47 Abbildungen, 10 Tabellen, 429 Literaturangaben.

Anhang: 31 Tabellen, 9 Abbildungen.

Schlüsselwörter: Alzheimersche Erkrankung, Borna Disease Virus (BDV), Mikroglia, Phagozytose, β -Amyloid (β A), Plaques, Tg2576

Bei der Alzheimerschen Erkrankung handelt es sich um eine progressiv verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, die die häufigste Form altersbedingter, kognitiver Dysfunktionen des Menschen darstellt. Sie ist pathomorphologisch durch eine fortschreitende Formation von amorphen und kompakten extrazellulären Amyloid-Ablagerungen (Plaques) sowie durch die Ausbildung intrazellulärer neurofibrillärer Bündel charakterisiert. Die Oligomerisierung und die Aggregation von β -Amyloid₁₋₄₂-Peptiden zu fibrillären Plaques und davon ausgehende neurodegenerative Veränderungen führen zu einer unspezifischen Aktivierung von Mikrogliazellen und zu Entzündungsprozessen im ZNS. Diese Antigen-unspezifische Form der Mikroglia-Aktivierung ist neurotoxisch und fördert daher die Neurodegeneration im Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung. Mikroglia-Aktivierung ist allerdings nicht generell neurotoxisch, da es verschiedene, in der vorliegenden Arbeit diskutierte Arten von mikroglialer Aktivierung mit jeweils unterschiedlichen – neurotoxischen bis hin zu neuroprotektiven - Auswirkungen gibt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die mikrogliale Aktivierung in einem Mausmodell des Morbus Alzheimer zu modulieren und die resultierenden Effekte zu charakterisieren. Für die Modulation der mikroglialen Aktivierung wurde die subklinische Infektion mit dem neurotrophen Borna Disease Virus (BDV) genutzt. Um den Einfluss der veränderten mikroglialen Aktivierung auf die zerebrale β -Amyloid-Belastung zu untersuchen, wurden *swAPP*-transgene Mäuse der Linie Tg2576 verwendet, die die schwedische Mutationsvariante des humanen *app* überexprimieren. Diese Mäuse produzieren humane β -Amyloid-Peptide, die sich mit zunehmendem Alter zu Plaques formieren.

Transgene Mäuse wurden in drei Altersgruppen (11, 13,5 und 18 Monate) BDV-infiziert. Vier Wochen später wurden im Gehirn der Mäuse immunhistochemisch Lymphozyteninfiltration, Astroglia- und Mikroglia-Aktivierung untersucht. Die zerebrale β A-Belastung dieser BDV-infizierten Mäuse wurde mittels β A₁₋₄₂-Immunhistochemie und Thioflavin-S-Markierung histometrisch quantifiziert und mit nicht infizierten, transgenen Kontrollmäusen verglichen. Auch eine biochemische Analyse der β A₁₋₄₀- und β A₁₋₄₂-Peptide mittels ELISA wurde

vorgenommen. Zu keinem Zeitpunkt wurde eine klinisch manifeste BDV-Erkrankung registriert; die BDV-infizierten Mäuse blieben klinisch unauffällig.

β A-Ablagerungen allein waren nur bei massiver Formation in der Lage, einzelne Mikrogliazellen zu aktivieren. Erst die intrazerebrale BDV-Infektion induzierte vorrangig CD₄-T-lymphozytäre Infiltrationen sowie eine deutliche BDV-spezifische Aktivierung der Mikrogliazellen, die vier Wochen p.i. maximal ausgeprägt waren. Es lag eine positive lokale und graduelle Korrelation zwischen CD₄-T-Lymphozyteninfiltrationen und Mikroglia-Aktivierung in den Gehirnen BDV-infizierter Mäuse vor. Bis auf eine Untersuchungsgruppe wurde keine nachweisbare Reaktion der Astroglia - weder auf die BDV-Infektion, noch auf die β A-Ablagerungen - registriert. In allen untersuchten Altersgruppen wurde ein tendenziell reduzierter β A-Gehalt in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren registriert. Diese β A-Reduktion nach BDV-Infektion war in der Altersgruppe 13,5 Monate am deutlichsten ausgeprägt, wo die β A-Belastung der BDV-infizierten Tiere in vielen untersuchten Arealen signifikant geringer war als die der Kontrolltiere. Eine lokale Korrelation zwischen Mikroglia-Aktivierung und β A-Reduktion wurde nicht nachgewiesen. In zahlreichen untersuchten Hirnarealen aller drei Altersgruppen war der Anteil von vaskulär lokalisiertem β -Amyloid in den Gehirnen der BDV-infizierten Mäuse gegenüber den nicht infizierten Kontrollmäusen signifikant erhöht.

Schlussfolgerungen:

- 1) In unserem Mausmodell führt die BDV-Infektion zu einer Modulation der Mikroglia-Aktivierung.
- 2) Die Korrelation der Mikroglia-Aktivierung mit viral bedingter T-Zellinfiltration und erhöhter Zytokinexpression deutet auf adaptive, T-Zell-vermittelte Modulation als Induktor dieser Aktivierung.
- 3) Die BDV-induzierte Mikroglia-Aktivierung führt zu einer:
 - a) β -Amyloid-Reduktion, an der vermutlich von spezifisch aktivierten Mikrogliazellen ausgehende Clearance-Mechanismen beteiligt sind.
 - b) β -Amyloid-Umverteilung vom Parenchym zu den Gefäßen, vermutlich, um den β A-Abtransport über das Gefäßsystem zu realisieren, wobei Amyloid-Einlagerungen in die Gefäßwände möglich sind.
- 4) Die viral induzierte Mikroglia-Aktivierung hängt sowohl vom Alter als auch von möglicher Voraktivierung der Zellen ab; altersbedingte Dysfunktionalität der Mikroglia ist eine potentielle Ursache der geringeren β -Amyloid-Clearance in der Altersgruppe 18 Monate.
- 5) Die Modulation der Mikroglia-Aktivierung ist prinzipiell möglich und führt zu potentiell positiven Effekten.
- 6) Dieses Modell ist zur Untersuchung der Modulation mikroglialer Aktivierung über adaptive Mechanismen geeignet.

7 Summary

Christine Reimers

The Impact of Borna-Disease-Virus (BDV)-induced Inflammation on the Amyloid- β -Load in a Transgenic Mouse Model of Morbus Alzheimer

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2007

104 pages, 47 figures, 10 tables, 429 references.

Appendix: 31 tables, 9 figures.

Keywords: Alzheimer's Disease, Borna Disease Virus (BDV), microglia, phagocytosis, amyloid- β (A β), plaques, Tg2576

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder and the most common form of age-related cognitive failure in humans. Pathomorphologically, it is characterized by a progressive accumulation of amorphous and compact extracellular amyloid- β deposits (plaques) as well as intracellular neurofibrillary tangles. Oligomerization and aggregation of amyloid- β_{1-42} , its formation of fibrillary deposits as well as associated neurodegenerative changes lead to an unspecific activation of microglial cells and to inflammatory processes in the CNS. This unspecific form of microglial activation is neurotoxic and enhances neurodegeneration in the course of Alzheimer's Disease. However, microglial activation is not neurotoxic *per se*, since there are various types of microglial activation that are being discussed in this study; the different activation types have varying effects reaching from neurotoxic to neuroprotective.

The aim of the study was to modify microglial activation in a mouse model of Morbus Alzheimer and to characterize the resulting effects. For the modulation of microglial activation, we used the subclinic infection with the neurotropic Borna Disease Virus (BDV). In order to study the impact of the modulated microglial activation on the cerebral amount of beta-amyloid material, we used swAPP-transgenic Tg2576 mice, which overexpress the Swedish mutation variant of the human APP. These mice produce human amyloid β peptides that form amyloid plaques upon aging.

We infected transgenic mice intracerebrally with BDV at different ages (11, 13,5 and 18 months old) and investigated brain-sections of these mice four weeks later by means of immunohistochemistry with regard to lymphocytic infiltrations, astroglial and microglial activation.

The amount of amyloid β in the brains of BDV-infected mice was compared to that of non-infected, transgenic mice. The investigation of the cerebral amyloid β load was realized immunohistochemically by using an anti-A β_{1-42} -antibody as well as by means of Thioflavin-S fluorescence technique followed by histometric quantification. Additionally, a biochemical

analysis of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides was done using an ELISA-kit. A clinically apparent BDV-disorder could not be seen at any stage; BDV-infected mice remained free of BDV symptoms. Only massive amyloid- β deposits were able to independently induce activation of single microglial cells. Intracerebral BDV-infection caused marked infiltrations of primarily CD₄-T-lymphocytes as well as a prominent specific microglial activation, which reached maximum levels four weeks p.i. A positive local and gradual correlation of CD₄-T-lymphocytes and microglial activation was registered in the brains of BDV-infected mice. Except one age group, neither BDV-infection nor amyloid- β deposits induced a detectable reaction of astrocytes. In all investigated age groups, a reduced amount of amyloid- β could be measured in the brains of BDV-infected mice compared to non-infected control mice. This A β reduction after BDV-infection was most prominent in the age group 13,5 months, where A β -load of BDV-infected mice was significantly decreased in many brain areas compared to that of control mice. A local correlation of microglial activation and A β reduction could not be observed. Several brain areas in all three age groups showed a significantly higher amount of vascular amyloid- β in the brains of BDV-infected mice compared to those of non-infected controls.

Conclusions:

- 1) In our mouse model, BDV-infection leads to a modulation of microglial activation.
- 2) The correlation of microglial activation with viral-induced infiltrations of T cells and with upregulated cytokine expression suggests an adaptive, T cell-induced modulation as trigger of this activation.
- 3) BDV-specific microglial activation leads to:
 - a) Reduced cerebral amyloid- β load, possibly realized by clearance mechanisms of activated microglial cells.
 - b) Redistribution of amyloid- β from the parenchyma to the vessels, possibly in order to clear the amyloidogenic material via the vasculature. During these processes, amyloid deposition in the walls of the cerebral blood vessels is possible.
- 4) Viral-induced microglial activation depends on the cell's age and possible pre-activation; dysfunctional changes in microglia might be a cause for the less effective A β -clearance observed in the age group 18 months.
- 5) In principle, modulation of microglial activation is possible and leads to potential beneficial effects.
- 6) This study displays a proper model for investigations of the modulation of microglial activation via adaptive mechanisms.

8 Literaturverzeichnis

1. ADAPT Research Group. Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology*. 2007; 68(21):1800-8.
2. Adler G, Frölich L, Gertz H-J, Hampel H, Kurz A, Mielke R et al. Diagnostik und Therapie der Demenz in der Primärversorgung. *Zeitschrift für Allgemeinmedizin*. 1999; 75:2-5.
3. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000; 21(3):383-421.
4. Allmang U, Hofer M, Herzog S, Bechter K, Staeheli P. Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry*. 2001; 6(3):329-33.
5. Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Levi G. Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities. *J Neurosci Res*. 1999; 56:571-80.
6. Aloisi F. Immune Function of Microglia. *Glia*. 2001; 36:165-79.
7. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr f Psychiatr*. 1907; 64:146-8.
8. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol*. 2002; 72(1):101-6.
9. Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res*. 2001; 894(1):21-30.
10. Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22(7):475-84.
11. Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JN, Lokensgard JR. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol*. 2005; 175:4189-93.
12. Ard MD, Cole GM, Wei J, Mehrle AP, Fratkin JD. Scavenging of Alzheimer's amyloid beta-protein by microglia in culture. *J Neurosci Res*. 1996; 43(2):190-202.
13. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 1981; 11:805-15.
14. Bacher M, Weihe E, Dietzschold B, Meinhardt A, Vedder H, Gemsa D et al. Borna disease virus-induced accumulation of macrophage migration inhibitory factor in rat brain astrocytes is associated with inhibition of macrophage infiltration. *Glia*. 2002; 37(4):291-306.
15. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci*. 1996; 16(24):7910-9.

16. Bacskai BJ, Kajdasz ST, Christie RH, Carter C, Games D, Seubert P et al. Imaging of amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med.* 2001; 7(3):369-72.
17. Bacskai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Games D, Seubert P, Schenk D et al. Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *J Neurosci.* 2002; 22(18):7873-8.
18. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci.* 2003; 23(7):2665-74.
19. Banati RB, Graeber MB. Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci.* 1994; 16(3-4):114-27.
20. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8(2):113-26.
21. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 2000; 6(8):916-9.
22. Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D et al. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(4):2023-8.
23. Barrera P, Joosten LA, den Broeder AA, van de Putte LB, van Riel PL, van den Berg WB. Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin 1 and TNFalpha in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60(7):660-9.
24. Bauer J. Die Alzheimer Krankheit. Neurobiologie, Psychosomatik, Diagnostik und Therapie. Stuttgart, New York: Schattauer. 1994.
25. Bautista JR, Schwartz GJ, De La Torre JC, Moran TH, Carbone KM. Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull.* 1994; 34(1):31-40.
26. Bautista JR, Rubin SA, Moran TH, Schwartz GJ, Carbone KM. Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995; 90(1-2):45-53.
27. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia.* 2000; 29(4):293-304.
28. Begley D, Brightman M. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. Prokai L, Prokai-Tatrai K, editors. *Progress in Drug Research* 61. 2003. Basel, Birkhauser Verlag.
29. Billich C. Charakterisierung von Borna Disease Virus-spezifischen Antikörpern in Human- und Tierseren. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. 2004.
30. Bilzer T, Stitz L. Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch Virol Suppl.* 1993; 7:153-9.

31. Bilzer T, Stitz L. Immune-mediated brain atrophy. CD8+ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *J Immunol.* 1994; 153(2):818-23.
32. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(1):330-5.
33. Blasko I, Apochal A, Boeck G, Hartmann T, Grubeck-Loebenstien B, Ransmayr G. Ibuprofen decreases cytokine-induced amyloid beta production in neuronal cells. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(6):1094-1101.
34. Blasko I, Grubeck-Loebenstien B. Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Aging.* 2003; 20(2):101-13.
35. Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell.* 1997; 90(4):589-92.
36. Block ML, Zecca L, Hong J. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience.* 2007; 8:57-69.
37. Bode L, Durrwald R, Rantam FA, Ferszt R, Ludwig H. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry.* 1996; 1(3):200-12.
38. Bode L. Borna Disease Virus - natürliche Infektion bei Tier und Mensch. Robert Koch-Institut, Berlin. 1999.
39. Bode L, Ludwig H. Borna Disease Virus Infection, a Human Mental-Health Risk. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003; 16(3):534-45.
40. Bolsi D. Placche senile e microglia. *Riv Patol Nerv Ment.* 1927; 32:65-72.
41. Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L et al. Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 2001.; 158(1):63-73.
42. Botchkina GI, Meistrell ME, III, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med.* 1997; 3(11):765-81.
43. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 1991; 82(4):239-59.
44. Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 1993; 337(4):543-67.
45. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61:1013-21.
46. Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem.* 1992; 267(1):546-54.
47. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 1995; 14(4):879-88.

48. Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation by microglia by aggregated β -amyloid of lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 29:381-93.
49. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 31:149-60.
50. Buxbaum JD, Koo EH, Greengard P. Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(19):9195-8.
51. Calingasan N, Erdely H, Altar C. Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol Aging.* 2002; 23:31-9.
52. Caplazi P, Waldvogel A, Stitz L, Braun U, Ehrensperger F. Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol.* 1994; 111(1):65-72.
53. Carbone KM, Park SW, Rubin SA, Waltrip RW, Vogelsang GB. Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol.* 1991; 65(11):6154-64.
54. Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* 1998; 282:1717-21.
55. Carty N, Wilcock D, Rosenthal A, Grimm J, Pons J, Ronan V et al. Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-A β antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. *J Neuroinflammation.* 2006; 3.
56. Chao CC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK. Tumor necrosis factor- α production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci.* 1995; 17:97-105.
57. Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. Tumor necrosis factor- α mediates the release of bioactive transforming growth factor- β in murine microglial cell cultures. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 77:358-65.
58. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354:610-21.
59. Chen K, Soriano F, Lyn W, Grajeda H, Masliah E, Games D. Effects of entorhinal cortex lesions on hippocampal β -amyloid deposition in PDAPP transgenic mice. *Soc Neurosci.* 1998; 24(5926):1502.
60. Chen YR, Glabe CG. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- β peptides A β 40 and A β 42: stable trimer or tetramer formation by A β 42. *J Biol Chem.* 2006; 281:24414-22.
61. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):156-9.
62. Chong Y. Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sci.* 1997; 61(23):2323-33.

63. Christie RH, Freeman M, Hyman BT. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1996; 148(2):399-403.
64. Chung H, Brazil MI, Soe TT, Maxfield FR. Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(45):32301-8.
65. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 1997; 3(1):67-72.
66. Citron M. Beta-secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2002; 70(3):373-9.
67. Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 1987; 223:284-8.
68. Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation.* 2006; 3:27.
69. Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, Landreth GE. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of β -amyloid and prion proteins. *J Neurosci.* 1999; 19:928-39.
70. Cooper NR, Kalaria RN, McGeer P.L., Rogers J. Key issues in Alzheimer's disease inflammation. *Neurobiol Aging.* 2000; 21:451-3.
71. Culhane AC, Hall MD, Rothwell NJ, Luheshi GN. Cloning of rat brain interleukin-18 cDNA. *Mol Psychiatry.* 1998; 3(4):362-6.
72. D'Andrea MR, Reiser PA, Gumula NA, Hertzog BM, Andrade-Gordon P. Application of triple immunohistochemistry to characterize amyloid plaque-associated inflammation in brains with Alzheimer's disease. *Biotech Histochem.* 2001; 76(2):97-106.
73. D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging.* 2004; 25(5):675-83.
74. Das P, Murphy MP, Younkin LH, ., Younkin SG, Golde TE. Reduced effectiveness of A β 1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiol Aging.* 2001; 22:721-7.
75. Das P, Golde TE. Open peer commentary regarding A β immunization and CNS inflammation by Pasinetti et al. *Neurobiol Aging.* 2002; 23:671-4.
76. de Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, van der Valk P. Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58:174-87.
77. de Groot CJ, Hulshof S, Hoozemans JJ, Veerhuis R. Establishment of microglial cell cultures derived from postmortem human adult brain tissue: immunophenotypical and functional characterization. *Microsc Res Tech.* 2001; 54(1):34-9.

78. De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C et al. The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54(2):175-87.
79. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du YS, Hamm K et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron.* 2004; 89:807-11.
80. Del Rio-Hortega P. Coloración rápida de tejidos normales y patológicos con carbonato de plata amoniacal. *Trab Lab Invest Biol.* 1919; 17:229-35.
81. Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D et al. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines by activated microglia. *J Leukoc Biol.* 1998; 63:740-5.
82. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(15):8850-5.
83. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM. Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science.* 2002; 295(5563):2264-7.
84. DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1998; 149(2):329-40.
85. Dhib-Jalbut S, Hoffman PM, Jamabe T, Sun D, Xia J, Eisenberg H et al. Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol.* 1994; 36:787-90.
86. DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D. Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2001; 22(6):1007-12.
87. Dietrich DE, Schedlowski M, Bode L, Ludwig H, Emrich HM. A viro-psycho-immunological disease-model of a subtype affective disorder. *Pharmacopsychiatry.* 1998; 31(3):77-82.
88. Dietzschold B, Schwaeble W, Schafer MKH, Hooper DC, Zehng YM, Petry F et al. Expression of C1q, a subcomponent of the rat complement system, is dramatically enhanced in brains of rats with either Borna disease or experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 1995; 130(1):11-6.
89. Dingwall C. Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2001; 108(9):1243-6.
90. Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci.* 2002; 5(5):452-7.
91. Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S et al. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2002; 52(2):253-6.
92. Doerfler P, Shearman MS, Perlmutter RM. Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:9312-7.

93. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint AP, Fang LY et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem.* 2001; 76(1):173-81.
94. Du Y, Ni B, Glinn M, Dodel RC, Bales KR, Zhang Z et al. Alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J Neurochem.* 1997; 69(1):299-305.
95. Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B et al. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer's disease. *Neurology.* 2001; 57(5):801-5.
96. Duara R, Lopez-Alberola RF, Barker WW, Loewenstein DA, Zatinsky M, Eisdorfer CE et al. A comparison of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993; 43(7):1377-84.
97. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J et al. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 1996; 383(6602):710-3.
98. Duffield JS. The inflammatory macrophage: A story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (London).* 2003; 104:27-38.
99. Dürrwald R, Ludwig H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *J Vet Med B.* 1997; 44:147-84.
100. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2001; 276(27):24540-8.
101. Eikelenboom P, Rozemuller AJ, Hoozemans JJ, Veerhuis R, van Gool WA. Neuroinflammation and Alzheimer disease: clinical and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2000; 14 Suppl 1:S54-61.
102. Eikelenboom P, Bate C, van Gool WA, Hoozemans JJ, Rozemuller JM, Veerhuis R et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia.* 2002; 40(2):232-9.
103. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature.* 1996; 382(6593):716-9.
104. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998; 19:81-4.
105. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C et al. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature Medicine.* 2007; 13(4):432-8.
106. Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000; 25:1439-51.
107. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC et al. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2002; 287(24):3223-9.
108. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 1990; 248(4959):1122-4.

109. Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Diehl TS, Moore CL, Tsai JY et al. Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(7):428-34.
110. Espey MG, Chernyshev ON, Reinhard JFJ, Namboodiri MA, Colton CA. Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid. *Neuroreport.* 1997; 8:431-4.
111. Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides.* 2002; 23(7):1285-97.
112. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101(4):890-8.
113. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000; 405(6782):85-90.
114. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(10):5856-61.
115. Finch CE, Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM. TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem.* 1993; 53(4):314-22.
116. Fischer B, Schmoll H, Riederer P, Bauer J, Platt D, Popa-Wagner A. Complement C1q and C3 mRNA expression in the frontal cortex of Alzheimer's patients. *J Mol Med.* 1995; 73(9):465-71.
117. Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Hadding U. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur J Immunol.* 1997; 27:1539-48.
118. Flanders KC, Lippa CF, Smith TW, Pollen DA, Sporn MB. Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; 45(8):1561-9.
119. Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.* 1998; 54(1):71-85.
120. Forloni G, Mangiarotti F, Angeretti N, Lucca E, De Simoni MG. Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF-alpha secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine.* 1997; 9(10):759-762.
121. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 2001; 22:189-216.
122. Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC. Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol (Berl).* 1992; 84(3):225-33.
123. Frautschy SA, Cole GM, Baird A. Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol.* 1992; 140(6):1389-99.
124. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K et al. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol.* 1998; 152(1):307-17.

125. Frederickson GG, Basch RS. L3T4 antigen expression by hematopoietic precursor cells. *J Exp Med.* 1989; 169:1473-8.
126. Gabuzda D, Busciglio J, Yankner BA. Inhibition of beta-amyloid production by activation of protein kinase C. *J Neurochem.* 1993; 61(6):2326-9.
127. Galea I, Bernades-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *J Exp Med.* 2007; 204:2023-30.
128. Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S, Fu SM. Human antibodies reactive with β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Exp Med.* 1993; 177:1181-6.
129. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol.* 1991; 146:286-92.
130. Gebicke-Haerter PJ, van Calker D, Norenberg W, Illes P. Molecular mechanisms of microglial activation: implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* 1996; 29:1-12.
131. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg JW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev.* 1995; 20:269-87.
132. Gelling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* 2002; 3:688-94.
133. George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science.* 1987; 235(4791):885-90.
134. George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2000; 47(3):183-99.
135. Giulian D, Baker TJ. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci.* 1986; 6(8):2163-78.
136. Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, Karshin WL, Yu J, Tom D et al. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int.* 1995; 27(1):119-37.
137. Giulian D, Haverkamp LJ, Yu JH, Karshin W, Tom D, Li J et al. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J Neurosci.* 1996; 16(19):6021-37.
138. Giulian D. Immune responses and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 835:91-110.
139. Glasky AJ, Melchior CL, Pirzadeh B, Heydari N, Ritzmann RF. Effect of AIT-082, a purine analog, on working memory in normal and aged mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 47(2):325-9.
140. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 120(3):885-90.

141. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991; 349(6311):704-6.
142. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000; 164(4):1663-7.
143. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*. 1996; 383(6600):550-3.
144. Golde TE. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *J Clin Invest*. 2003; 111(1):11-8.
145. Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 1998; 801(1-2):1-8.
146. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999; 22:219-40.
147. Gordon MN, Holcomb LA, Jantzen PT, DiCarlo G, Wilcock D, Boyett KW et al. Time Course of the Development of Alzheimer-like Pathology in the Doubly Transgenic PS1 + APP Mouse. *Exp Neurol*. 2002; 173:183-95.
148. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3:23-35.
149. Gosztanyi G, Ludwig H (a). Neurotransmitter receptors and viral neurotropism. *Neuropsychiat Clin*. 1984; 3:107-14.
150. Gosztanyi G, Ludwig H (b). Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1984; 64:213-21.
151. Gosztanyi G, Ludwig H. Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995; 190:39-73.
152. Goutte C. Genetics leads the way to the accomplices of presenilins. *Dev Cell*. 2002; 3(1):6-7.
153. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP et al. Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 1994; 269(15):10987-90.
154. Graeber MB, Banati RB, Streit WJ, Kreutzberg GW. Immunophenotypic characterization of rat brain macrophages in culture. *Neurosci Lett*. 1989; 103(3):241-6.
155. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathology*. 1990; 1:2-5.
156. Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R, Schoen SW, Kreutzberg GW. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J Neuroimmunol*. 1990; 27:121-32.
157. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1986; 261(13):6084-9.

158. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews*. 2007; 8:101-12.
159. Hallensleben W, Schwemmle M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecher A et al. Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol*. 1998; 72(5):4379-86.
160. Hampel H, Kamleiter M, Möller H-M. Neue Substanzen in der klinischen Prüfung : Zukunftsstrategien in der Pharmakotherapie der Alzheimerdemenz. *The Medical Journal*. 2003; 3/4(3/4):9-11.
161. Hanisch UK. Microglia as source and target of cytokines. *Glia*. 2002; 40(2):140-55.
162. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*. 1998; 1(5):355-8.
163. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580):353-6.
164. Hatalski CG, Hickey WF, Lipkin WI. Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol*. 1998; 90(2):137-42.
165. Hausmann J, Schamel K, Staeheli P. CD8(+) T lymphocytes mediate Borna disease virus-induced immunopathology independently of perforin. *J Virol*. 2001; 75(21):10460-6.
166. Hausmann J, Pagenstecher A, Baur K, Richter K, Rziha HJ, Staeheli P. CD8 T Cells Require Gamma Interferon To Clear Borna Disease Virus from the Brain and Prevent Immune System-Mediated Neuronal Damage. *Journal of Virology*. 2005; 79(21):13509-18.
167. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(7):461-2.
168. Herz J. Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell*. 2003; 112:289-92.
169. Herzog S, Rott R. Replication of Borna disease virus in cell culture. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1980; 168:153-8.
170. Herzog S, Wonigeit K, Frese K, Hedrich HJ, Rott R. Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *J Gen Virol*. 1985; 66 (Pt 3):503-8.
171. Hetier E, Ayala J, Bousseau A, Prochiantz A. Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by β -adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp BrainRes*. 1991; 86:407-13.
172. Hirano N, Kao M, Ludwig H. Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol*. 1983; 64 (Pt 7):1521-30.
173. Ho L, Pieroni C, Winger D, Purohit DP, Aisen PS, Pasinetti GM. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1999; 57(3):295-303.
174. Ho L, Qin W, Stetka BS, Pasinetti GM. Is there a future for cyclo-oxygenase inhibitors in Alzheimer's disease ? *CNS Drugs*. 2006; 20:85-98.

175. Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B et al. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2003; 38(4):547-54.
176. Hooper NM, Turner AJ. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2002; 9(11):1107-19.
177. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996; 274(5284):99-102.
178. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*. 1995; 15(5):1203-18.
179. Hume DA, Perry VH, Gordon S. The Mononuclear Phagocyte System of the Mouse defined by Immunohistochemical Localisation of Antigen F4/80: Macrophages Associated with Epithelia. *The Anatomical Record*. 1984; 210:503-12.
180. Hulse JT, Doms RW. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2000; 22(1-3):81-98.
181. Hyman BT, Smith C, Buldyrev I, Whelan C, Brown H, Tang MX et al. Autoantibodies to amyloid- β and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2001; 49(6):808-10.
182. Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D et al. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res*. 1998; 804(2):177-92.
183. Imbimbo BP. β -Amyloid immunization approaches for Alzheimer's disease. *Drug Development and Research*. 2002; 56:150-62.
184. Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(9):965-73.
185. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E et al. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000; 6(2):143-50.
186. Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC. Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res*. 2002; 70(3):493-500.
187. Jander S, Pohl J, D'Urso D, Gillen C, Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol*. 1998; 152:975-82.
188. Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, Wenk GL, Wallace JL, Rojiani AM et al. Microglial activation and beta-amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci*. 2002; 22(6):2246-54.
189. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD et al. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000; 408(6815):979-82.

190. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993; 32(18):4693-7.
191. Joest E, Degen K. Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes. *Z Inf Krkh Haustiere*. 1911; 9:1-98.
192. Kacza J, Vahlenkamp TW, Enbergs H, Richt JA, Germer A, Kuhrt H et al. Neuron-glia interactions in the rat retina infected by Borna disease virus. *Arch Virol*. 2000; 145(1):127-47.
193. Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A et al. Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2002; 158(3):551-61.
194. Kaisho T, Akira S. Critical roles for Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol*. 2000; 20:393-405.
195. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987; 325(6106):733-6.
196. Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol*. 1977; 6:797-807.
197. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001; 21(2):372-81.
198. Kehoe P, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P, Fenton I et al. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(2):237-45.
199. Kiefer R, Schweitzer T, Jung S, Toyka HV, Hartung HP. Sequential expression of transforming growth factor-beta-1 by T cells, macrophages and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; 57:385-95.
200. Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes J, Jonakait GM. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci*. 2000; 20:3622-30.
201. Kisilevsky R. Proteoglycans and other basement membrane proteins in amyloidoses. *Mol Neurobiol*. 1994; 9:23-4.
202. Klegeris A, McGeer PL. beta-amyloid protein enhances macrophage production of oxygen free radicals and glutamate. *J Neurosci Res*. 1997; 49(2):229-35.
203. Klegeris A, Walker DG, McGeer PL. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 results in a protein kinase C-dependent secretion of tumor necrosis factor-alpha. *Brain Res*. 1997; 747(1):114-21.
204. Koenigsknecht-Talboo J, Landreth G. Microglial Phagocytosis Induced by Fibrillar β -Amyloid and IgGs Are Differentially Regulated by Proinflammatory Cytokines. *J Neurosci*. 2005; 25(36):8240-9.

205. Koenigsknecht J, Landreth G. Microglial Phagocytosis of Fibrillar β -Amyloid through a β 1 Integrin-Dependent Mechanism. *Neurobiology of Disease*. 2004; 24(44):9838-46.
206. Kohl. Ueber die "Bornasche Krankheit" der Pferde. *Berl Thierärztl Wochenschr*. 1896; 12(39):462-4.
207. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science*. 1990; 248(4960):1227-30.
208. Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002; 22(15):6331-5.
209. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19(8):312-8.
210. Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, Sagi SA, Weggen S, Smith TE et al. Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting A β 42 production. *Nat Med*. 2005; 11(5):545-50.
211. Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett*. 1994; 345(1):33-7.
212. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1992; 48(2):405-15.
213. Ledbetter JA, Rouse RV, Micklem HS, Herzenberg LA. T cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med*. 1980; 152:280-95.
214. Lemere CA, Spooner ET, LaFrancois J, Malester B, Mori C, Leverone JF et al. Evidence for peripheral clearance of cerebral abeta protein following chronic, active abeta immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis*. 2003; 14(1):10-8.
215. Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM et al. Anti-A β 42- and anti-A β 40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(1):193-201.
216. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269(5226):973-7.
217. Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK et al. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(11):6138-43.
218. Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000; 20(15):5709-14.
219. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*. 2001; 21(21):8370-7.

- 220. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35(11):1505-35.
- 221. Lipkin WI, Carbone KM, Wilson MC, Duchala CS, Narayan O, Oldstone MB. Neurotransmitter abnormalities in Borna disease. *Brain Res.* 1988; 475(2):366-70.
- 222. Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962:318-31.
- 223. Liu JSH, Amaral TD, Brosnan CF, Lee SC. IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. *J Immunol.* 1998; 161:1989-96.
- 224. Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(25):12243-7.
- 225. Ludwig H, Bode L, Gosztanyi G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol.* 1988; 35:107-51.
- 226. Ludwig H, Bode L. The neuropathogenesis of Borna disease virus infections. *Intervirology.* 1997; 40(2-3):185-97.
- 227. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1999; 155(3):853-62.
- 228. Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM, Jr. et al. Inflammatory repertoire of Alzheimer's Disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia.* 2001; 35:72-9.
- 229. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; 338:436-45.
- 230. Lynch G. Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol Learn Mem.* 1998; 70(1-2):82-100.
- 231. Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS et al. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid- β 1-40: asymmetrical binding, endocytosis and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest.* 1998; 102:734-43.
- 232. Mannoji H, Yeger H, Becker LE. A specific histochemical marker (lectin Ricinus communis agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 1986; 71(3-4):341-3.
- 233. Masters & Bush, Helmuth L. New Alzheimer's Treatments That May Ease the Mind. *Science.* 2002; 297:1260.
- 234. Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H et al. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; 45(3 Pt 1):555-7.
- 235. McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human cathepsin D. *Neuroreport.* 1996; 7(13):2163-6.

- 236. McDonald DR, Brunden KR, Landreth GE. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci.* 1997; 17:2284-94.
- 237. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol.* 1999; 163(11):6164-72.
- 238. McGeer E.G., McGeer P.L. Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drugs.* 1997; 7:214-87.
- 239. McGeer EG, McGeer PL. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 1998; 33(5):371-8.
- 240. McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett.* 1987; 79(1-2):195-200.
- 241. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995; 21(2):195-218.
- 242. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2001; 22(6):799-809.
- 243. McKimmie CS, Fazakerley JK. In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J Neuroimmunol.* 2005; 169:116-25.
- 244. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1999; 46(6):860-6.
- 245. McManus CM, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J Immunol.* 1998; 160:1449-55.
- 246. Meda L, Cassatella A, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villaba M et al. Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon-gamma. *Nature.* 1995; 374:647-50.
- 247. Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R. Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical β -amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int J Dev Neurosci.* 2000; 18:423-31.
- 248. Mentlein R, Ludwig R, Martensen I. Proteolytic degradation of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide by a metalloproteinase from microglia cells. *J Neurochem.* 1998; 70(2):721-6.
- 249. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol.* 1998; 54:99-125.
- 250. Miyazono M, Iwaki T, Kitamoto T, Kaneko Y, Doh-ura K, Tateishi J. A comparative immunohistochemical study of Kuru and senile plaques with a special reference to glial reactions at various stages of amyloid plaque formation. *Am J Pathol.* 1991; 139(3):589-98.

251. Mohajeri MH, Wollmer MA, Nitsch RM. Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem.* 2002; 277(38):35460-5.
252. Monsonego A, Weiner HL. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science.* 2003; 302(5646):834-8.
253. Monsonego A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2003; 112(3):415-22.
254. Monsonego A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R et al. A β -induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of A β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(3):5048-53.
255. Moore AH, O'Banion MK. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54(12):1627-56.
256. Moore CL, Leatherwood DD, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS. Difluoro ketone peptidomimetics suggest a large S1 pocket for Alzheimer's gamma-secretase: implications for inhibitor design. *J Med Chem.* 2000; 43(18):3434-42.
257. Moran LB, Duke DC, Turkheimer FE, Banati RB, Graeber MB. Towards a transcriptome definition of microglial cells. *Neurogenetics.* 2004; 5:95-108.
258. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2000; 408(6815):982-5.
259. Morgan D, Gitter BD. Evidence supporting a role for anti-Abeta antibodies in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004; 25(5):605-8.
260. Morgan D, Gordon MN, Tan J, Wilcock D, Rojiani AM. Dynamic Complexity of the Microglial Activation Response in Transgenic Models of Amyloid Deposition: Implications for Alzheimer Therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64(9):743-53.
261. Morgan D. Modulation of microglial activation state following passive immunization in amyloid depositing transgenic mice. *Neurochem Int.* 2006; 49:190-4.
262. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today.* 1996; 17:138-46.
263. Moss DW, Bates TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci.* 2001; 13:529-38.
264. Mosser D. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003; 73:209-212.
265. Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J et al. Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2006; 51(6):703-14.
266. Mukherjee A, Song E, Kihiko-Ehmann M, Goodman JPr, Pyrek JS, Estus S et al. Insulysin hydrolyzes amyloid beta peptides to products that are neither neurotoxic nor deposit on amyloid plaques. *J Neurosci.* 2000; 20(23):8745-9.

- 267. Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside. *Dev Biol.* 2000; 228:151-65.
- 268. Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM. Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J Neurosci.* 1999; 19(10):3791-800.
- 269. Nadeau S, Rivest S. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor-kappaB activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci.* 2000; 20:3456-68.
- 270. Nakagawa Y, Reed L, Nakamura M, McIntosh TK, Smith DH, Saatman KE et al. Brain trauma in aged transgenic mice induces regression of established abeta deposits. *Exp Neurol.* 2000; 163(1):244-52.
- 271. Narayan O (a), Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science.* 1983; 220(4604):1401-3.
- 272. Narayan O (b), Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis.* 1983; 148(2):305-15.
- 273. Narindrasorasak S, Young I, Aubin S, Ludwin SK, Kisilevsky R. Basement membrane heparan sulfate proteoglycan is part of isolated Alzheimer's amyloid plaques. *Neurobiol Aging.* 1990; 11:303.
- 274. Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem.* 1997; 69(5):1904-11.
- 275. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 2000; 283(12):1571-7.
- 276. Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:5779-84.
- 277. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med.* 2003; 9(4):448-52.
- 278. Nicoll JA, Barton E, Boche D, Neal JW, Ferrer I, Thompson P et al. A β Species Removal After A β 42 Immunization. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65(11):1040-8.
- 279. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 2000; 483(1):6-10.
- 280. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 1998; 8:275-83.
- 281. Oehmichen M. Enzyme-histochemical differentiation of neuroglia and microglia: a contribution to the cytogenesis of microglia and globoid cells. *Path Res Pract.* 1980; 168:344-73.

282. Oehmichen M, Wiethölter H, Gencic M. Cytochemical markers for mononuclear phagocytes as demonstrated in reactive microglia and globoid cells. *Acta histochem* (Jena). 1980; 66:243-52.
283. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 2004; 173:3916-24.
284. Orzylowska O, Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Januszewski S, Mossakowski M. Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett*. 1999; 263(1):72-6.
285. Osaka H, Mukherjee P, Aisen PS, Pasinetti GM. Complement-derived anaphylatoxin C5a protects against glutamate-mediated neurotoxicity. *J Cell Biol*. 1999; 73(3):303-11.
286. Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*. 1996; 17(3):553-65.
287. Paresce DM, Chung H, Maxfield FR. Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem*. 1997; 272(46):29390-7.
288. Paxinos G, Franklin KB. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second ed. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo. 2001.
289. Peress NS, Perillo E. Differential expression of TGF-beta 1, 2 and 3 isotypes in Alzheimer's disease: a comparative immunohistochemical study with cerebral infarction, aged human and mouse control brains. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995; 54(6):802-11.
290. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985; 15(2):313-26.
291. Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, Ulevitch RJ et al. CD14-receptor mediated uptake of non-opsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun*. 1995; 63:1598-602.
292. Petit A, Bihel F, Alves dC, Pourquie O, Checler F, Kraus JL. New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(5):507-11.
293. Planz O, Bilzer T, Sobbe M, Stitz L. Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med*. 1993; 178(1):163-74.
294. Planz O, Bilzer T, Stitz L. Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J Virol*. 1995; 69(2):896-903.
295. Poduslo JF, Curran GL, Haggard JJ, Biere AL, Selkoe DJ. Permeability and residual plasma volume of human, Dutch variant, and rat amyloid beta-protein 1-40 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 1997; 4(1):27-34.
296. Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR et al. Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58(10):1078-89.

297. Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, Seubert P, Selkoe DJ. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(10):6641-6.
298. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998; 273(49):32730-8.
299. Qiu Z, Strickland DK, Hyman BT, Rebeck GW. Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J Neurochem.* 1999; 73(4):1393-8.
300. Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest.* 1991; 87(4):1360-6.
301. Quinn J, Montine T, Morrow J, Woodward WR, Kulhanek D, Eckenstein F. Inflammation and cerebral amyloidosis are disconnected in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.* 2003; 137:32-41.
302. Raivich G, Moreno-Flores MT, Möller JC, Kreutzberg GW. Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur J Neurosci.* 1994; 6:1615-8.
303. Rauer M, Götz J, Schuppli D, Staeheli P, Hausmann J. Transgenic mice expressing the nucleoprotein of Borna Disease Virus in either neurons or astrocytes: decreased susceptibility to homotypic infection and disease. *Journal of Virology.* 2004; 78(7):3621-32.
304. Reske-Nielsen E, Gregersen M, Lund E. Astrocytes in the postnatal central nervous system. *Acta path microbiol immunol scand Sect A.* 1987; 95:347-56.
305. Ricciarelli R, D'Abramo C, Zingg J, Giliberto L, Markesbery W, Azzi A et al. CD36 overexpression in human brain correlates with beta-amyloid deposition but not with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36:1018-24.
306. Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics.* 2007; 39(2):168-77.
307. Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1993; 43(8):1609-11.
308. Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M et al. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 1996; 17(5):681-6.
309. Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2001; 39(5-6):333-40.
310. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia.* 2002; 40(2):260-9.
311. Rojas-Fernandez CH, Chen M, Fernandez HL. Implications of amyloid precursor protein and subsequent beta-amyloid production to the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.* 2002; 22(12):1547-63.

312. Rott R, Becht H. Natural and experimental Borna disease in animals. In: Koprowski H, Lipkin I, editors. Borna disease. Berlin: Springer Verlag KG. 1995: 17-30.
313. Rozemuller JM, Eikelenboom P, Kamphorst W, Stam FC. Lack of evidence for dysfunction of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Neurobiol Aging*. 1988; 9(4):383-91.
314. Rubin SA, Waltrip RW, Bautista JR, Carbone KM. Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol*. 1993; 67(1):548-52.
315. Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M et al. Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch*. 2002; 441:358-67.
316. Schamel K, Staeheli P, Hausmann J. Identification of the immunodominant H-2K(k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *J Virol*. 2001; 75(18):8579-88.
317. Schellenberg GD, Payami H, Wijsman EM, Orr HT, Goddard KA, Anderson L et al. Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease (FAD). *Am J Hum Genet*. 1993; 53(3):619-28.
318. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999; 400(6740):173-7.
319. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996; 2(8):864-70.
320. Schluesener HJ, Seid K, Deininger M, Schwab J. Transient in vivo activation of rat brain macrophages/microglia and astrocytes by immunostimulatory multiple CpG oligonucleotides. *J Neuroimmunol*. 2001; 113:89-94.
321. Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S. Glia-related pathomechanisms in Alzheimer's disease: a therapeutic target? *Mech Ageing Dev*. 2001; 123(1):47-57.
322. Schwab C, Hosokawa M, McGeer P.L. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Exp Neurol*. 2004; 188:52-64.
323. Schwemmle M. Borna disease virus infection in psychiatric patients: are we on the right track? *Lancet Infect Dis*. 2001; 1(1):46-52.
324. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol*. 1999; 163(2):920-6.
325. Seiffert D, Bradley JD, Rominger CM, Rominger DH, Yang F, Meredith JE, Jr. et al. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem*. 2000; 275(44):34086-91.
326. Seifried O, Spatz H. Die Ausbreitung der encephalitischen Reaktion bei der Bornaschen Krankheit der Pferde und deren Beziehungen zu der Encephalitis epidemica, der Heine-Medinschen Krankheit und der Lyssa des Menschen. Eine vergleichend-pathologische Studie. *Z Neurol Psychiatry*. 1930; 124:317-82.

- 327. Selkoe DJ. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1996; 271(31):18295-8.
- 328. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 1999; 399(6738 Suppl):A23-31.
- 329. Selkoe DJ (a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81(2):741-66.
- 330. Selkoe DJ (b). Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron.* 2001; 32:177-80.
- 331. Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43:545-84.
- 332. Shaffer LM, Dority MD, Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Younkin SG, Brunden KR. Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol Aging.* 1995; 16(5):737-45.
- 333. Shearman MS, Behr D, Clarke EE, Lewis HD, Harrison T, Hunt P et al. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry.* 2000; 39(30):8698-704.
- 334. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol (Berl).* 1998; 95:229-34.
- 335. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2000; 106(12):1489-99.
- 336. Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T et al. Activation of NADPH Oxidase in Alzheimer's Disease Brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273:5-9.
- 337. Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T. Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2001; 159(2):439-47.
- 338. Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science.* 1990; 248(4954):492-5.
- 339. Sisodia SS. Secretion of the beta-amyloid precursor protein. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 674:53-7.
- 340. Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3):787-94.
- 341. Smith MF, van der Maesen K, Somera FP. Macrophages and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *J Neurosci Res.* 1998; 54:68-78.
- 342. Snyder SH. *Drugs and the brain.* New York: Scientific American Books, Inc. 1986.

- 343. Sobbe M, Bilzer T, Gommel S, Noske K, Planz O, Stitz L. Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8+ T cells and perforin mRNA. *J Virol.* 1997; 71(3):2400-7.
- 344. Solomon B. Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* 2001; 20(11):697-703.
- 345. Sommer B, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Wiederhold KH, Calhoun M, Jucker M et al. Transgenic approaches to model Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 2000; 11(1):47-51.
- 346. Soto C. Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Mol Med Today.* 1999; 5(8):343-50.
- 347. Stahl T. Die Trisomie 16 der Maus als Modell zur Untersuchung von Dosiseffekten des Amyloidvorläuferproteins an Feten und intrazerebroventrikulären Transplantaten. Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät und Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig. 1998.
- 348. Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol.* 1999; 154(6):1673-84.
- 349. Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J et al. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nature Cell Biol.* 2000; 2:848-51.
- 350. Steinfeld SD, Demols P, Salmon I, Kiss R, Appelboom T. Infliximab in patients with primary Sjogren's syndrome: a pilot study. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(10):2371-5.
- 351. Stitz L, Soeder D, Deschl U, Frese K, Rott R. Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol.* 1989; 143(12):4250-6.
- 352. Stitz L, Schilken D, Frese K. Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *J Virol.* 1991; 65(1):457-60.
- 353. Stitz L, Sobbe M, Bilzer T. Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J Virol.* 1992; 66(6):3316-23.
- 354. Stitz L, Rott R. Borna Disease Virus. In: Webster R, Garoff A, editors. *Encyclopedia of Virology.* New York Academic. 1993: 149-54.
- 355. Stitz L, Bilzer T, Richt JA, Rott R. Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol Suppl.* 1993; 7:135-51.
- 356. Stitz L, Dietzschold B, Carbone KM. Immunopathogenesis of Borna Disease. In: Koprowski H, Lipkin I, editors. *Borna Disease.* Berlin: Springer Verlag KG. 1995: 75-92.
- 357. Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 1999; 58(3):233-47.
- 358. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J Neural Transm.* 2000; 59:81-9.

- 359. Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol.* 1987; 16(2):249-60.
- 360. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* 1988; 1(5):301-7.
- 361. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 1999; 57:563-81.
- 362. Streit WJ (a). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002; 40(2):133-9.
- 363. Streit WJ (b). Physiology and Pathophysiology of microglial cell function. In: Streit WE, editor. *Microglia in the regenerating and degenerating CNS.* New York: Springer Verlag. 2002: 1-14.
- 364. Streit WJ. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res.* 2004; 77(1):1-8.
- 365. Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia.* 2004; 45(2):208-12.
- 366. Suzuki S, Tanaka K, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y. Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 1999; 262(2):117-20.
- 367. Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(16):7789-93.
- 368. Tanzi RE, George-Hyslop PH, Gusella JF. Molecular genetic approaches to Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1989; 12(4):152-8.
- 369. Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience.* 1996; 72(2):377-89.
- 370. Tchelingierian JL, Vignais L, Jacque C. TNF alpha gene expression is induced in neurones after a hippocampal lesion. *Neuroreport.* 1994; 5(5):585-8.
- 371. Terry RD, GONATAS NK, WEISS M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol.* 1964; 44:269-97.
- 372. Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS. *Alzheimer Disease.* 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999.
- 373. Tienari PJ, Ida N, Ikonen E, Simons M, Weidemann A, Multhaup G et al. Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(8):4125-30.
- 374. Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B et al. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J.* 2000; 348 Pt 2:359-65.
- 375. Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhira S et al. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families)

- increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(5):2025-30.
376. Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H et al. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J Biol Chem*. 1996; 271(12):6839-44.
377. Town T, Nikolic V, Tan J. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation*. 2005; 2(24).
378. Townsend KP, Town T, Mori T, Lue L, Shytle D, Sanberg PR et al. CD40 signaling regulates innate and adaptive activation of microglia in response to amyloid β -peptide. *Eur J Immunol*. 2005; 35:901-10.
379. Trieb K, Ransmayr G, Sgonc R, Lassmann H, Grubeck-Loebenstien B. APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1996; 17:541-7.
380. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D et al. The Plasmin System Is Induced by and Degrades Amyloid- β Aggregates. *J Neurosci*. 2000; 20(11):3937-46.
381. Urrea JM, Arteta M, Gomez-Caturra A, Garcia-Duran F. A chimeric anti-TNF α monoclonal antibody (cA2) in vivo removes TNF α -producing cells in Crohn's disease. *Hum Antibodies*. 2001; 10(2):91-4.
382. van der Wal EA, Gomez-Pinilla F, Cotman CW. Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*. 1993; 4(1):69-72.
383. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V et al. Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*. 2000; 20(5):1657-65.
384. Viale G, Gambacorta M, Coggi G, Dell'Orto P, Milani M, Doglioni C. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat*. 1991; 418:339-48.
385. Volbracht C, van Beek J, Zhu C, Blomgren K, Leist M. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *Eur J Neurosci*. 2006; 23:2611-22.
386. Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ. Effects of Dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's Disease. *International Journal of Geriatrics and Psychiatry*. 1997; 12:913-9.
387. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997; 390(6658):350-1.
388. von Bernhardi R, Ramirez G. Microglia-astrocyte interaction in Alzheimer's disease: friends or foes for the nervous system? *Biol Res*. 2001; 34(2):123-8.
389. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol*. 1992; 12(2):61-74.
390. Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*. 1999; 158(2):328-37.

- 391. Webster SD, Yang AJ, Margol L, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. *Exp Neurol*. 2000; 161(1):127-38.
- 392. Webster SD, Galvan MD, Ferran E, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. *J Immunol*. 2001; 166(12):7496-503.
- 393. Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*. 2001; 414(6860):212-6.
- 394. Wei R, Jonakait GM. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured microglia. *J Neuroimmunol*. 1999; 95:8-18.
- 395. Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C et al. Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2000; 48(4):567-79.
- 396. Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E et al. Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci*. 1998; 18(6):2161-73.
- 397. Wilcock DM, Gordon MN, Ugen KE, Gottschall PE, DiCarlo G, Dickey C et al. Number of Abeta inoculations in APP+PS1 transgenic mice influences antibody titers, microglial activation, and congophilic plaque levels. *DNA Cell Biol*. 2001; 20(11):731-6.
- 398. Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE et al. Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci*. 2003; 23(9):3745-51.
- 399. Wilcock DM (a), Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN et al. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2004; 1(1):24.
- 400. Wilcock DM (b), Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J et al. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci*. 2004; 24(27):6144-51.
- 401. Wilcock DM (c), Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis*. 2004; 15(1):11-20.
- 402. Williams K, Bar-Or A, Ulvestad E, Olivier A, Antel JP, Yong VW. Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992; 51(5):538-49.
- 403. Wisniewski HM, Terry RD. Re-examination of the pathogenesis of the senile plaque. *Prog Neuropathol*. 1973; 2:1-25.
- 404. Wisniewski HM, Barcikowska M, Kida E. Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991; 81(5):588-90.

405. Wisniewski HM, Weigel J. Migration of perivascular cells into the neuropil and their involvement in beta-amyloid plaque formation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1993; 85(6):586-95.
406. Wolfe MS (a), De Los AJ, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1999; 38(35):11223-30.
407. Wolfe MS (b), Xia W, Moore CL, Leatherwood DD, Ostaszewski B, Rahmati T et al. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*. 1999; 38(15):4720-7.
408. Wood C, Kabat EA, Murphy LA, Goldstein IJ. Immunochemical studies of the combining sites of the two isolectins, A4 and B4, isolated from *Bandeiraea simplicifolia*. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 198(1):1-11.
409. Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L. Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol*. 1997; 77(1):45-50.
410. Wyss-Coray T (a), Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L et al. TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med*. 2001; 7(5):612-8.
411. Wyss-Coray T (b), McConlogue L, Kindy M, Schmidt AM, Du Yan S, Stern DM. Key signaling pathways regulate the biological activities and accumulation of amyloid-beta. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6):967-73.
412. Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ et al. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(16):10837-42.
413. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 2003; 9(4):453-7.
414. Xu H, Greengard P, Gandy S. Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 1995; 270(40):23243-5.
415. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA*. 1998; 279(9):688-95.
416. Yamada T, Miyazaki K, Koshikawa N, Akatsu H, Yamamoto T, Takahashi M. Selective localization of gelatinase A, an enzyme degrading β -amyloid protein in white matter microglia and in Schwann cells. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1995; 89(3):199-203.
417. Yamaguchi H, Nakazato Y, Hirai S, Shoji M, Harigaya Y. Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol*. 1989; 135(4):593-7.
418. Yamin R, Malgeri EG, Sloane JA, McGraw WT, Abraham CR. Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 is necessary for Alzheimer's amyloid-beta peptide degradation. *J Biol Chem*. 1999; 274(26):18777-84.
419. Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P et al. Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med*. 1995; 1(7):693-9.

- 420. Yan SD, Chen X. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996; 382:685-91.
- 421. Yan SD, Roher A, Schmidt AM, Stern DM. Cellular cofactors for amyloid beta-peptide-induced cell stress. Moving from cell culture to in vivo. *Am J Pathol*. 1999; 155(5):1403-11.
- 422. Yao J, Harvath L, Gilbert DL, Colton CA. Chemotaxis by a CNS macrophage, the microglia. *J Neurosci Res*. 1990; 27(1):36-42.
- 423. Younkin SG. Amyloid beta vaccination: reduced plaques and improved cognition. *Nat Med*. 2001; 7(1):18-9.
- 424. Yu G, Chen F, Levesque G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L et al. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem*. 1998; 273(26):16470-5.
- 425. Zhao B, Schwartz JP. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res*. 1998; 52(1):7-16.
- 426. Zhou J, Fonseca MI, Kaye R, Hernandez I, Webster SD, Yazan O et al. Novel A β peptide immunogens modulate plaque pathology and inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2005; 2(28).
- 427. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature*. 1990; 344(6268):742-6.
- 428. Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey R.T. et al. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(9):4229-34.
- 429. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2004; 89:807-11.

Internetquellen:

National Institute on Aging. U.S. National Institutes of Health (zitiert am 10.10.2007).
<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/ADProgress2005_2006/Part2/closer.htm>

Anhang I: Antikörper, Lektine, Lösungen, Chemikalien und Puffer

Antikörper und Lektine

Tab. Ia: Primärantikörper und Lektine Immunhistochemie

(*): Zellkulturüberstand; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Richt, Gießen

Antikörper	Detektierte Struktur	Hersteller	Referenz	Endkonzentration/ Verdünnung
Kaninchen anti-humanes βA_{1-42} , polyklonal	β -Amyloid ₁₋₄₂	Chemikon	BARD et al.(2000)	1 μ g / ml
Kaninchen anti-humanes βA_{1-40} (Signal Select™)	β -Amyloid ₁₋₄₀	BioSource	KAWARABAYASHI et al. (2001); APELT et al. (2004)	lt. Herstellerangaben
Kaninchen anti-humanes βA_{1-42} (Signal Select™)	β -Amyloid ₁₋₄₂	BioSource	KAWARABAYASHI et al. (2001); APELT et al. (2004)	lt. Herstellerangaben
Maus anti-BDV-Nukleoprotein (Bo 18), monoklonal	BDV-Nukleoprotein	Jürgen Richt, Gießen (*)	KACZA et al. (2000) STITZ et al. (1992)	1 : 100
Ratte anti-Maus CD ₄ , monoklonal; Klon RM 4-5	CD ₄ -T-Lymphozyten	BD PharMingen	FREDERICKSON & BASCH (1989)	1 : 100
Ratte anti-Maus CD _{8a} , monoklonal; Klon 53-6.7	CD ₈ -T-Lymphozyten	BD PharMingen	LEDBETTER et al. (1980)	1 : 20
Ratte anti-Maus F4/80; monoklonal; Klon A3-1	Mikroglia/Makropagen	Serotec	AUSTYN et al. (1981)	1 : 200 (Fluoreszenz) 1 : 500 (IHC)
Kaninchen anti-Rind GFAP, polyklonal	Astroglia	DAKO	VIALE et al. (1991)	1 : 1000
Griffonia simplicifolia Isolektin B4 (GSA/B4), Biotin-konjugiert	Gefäße, Mikroglia	Sigma	WOOD et al. (1979)	1 : 20

Tab. Ib: Detektionsreagentien Immunhistochemie und –fluoreszenz, ELISA

Antikörper / Avidin	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG	Biotin	DAKO	1 : 500
Ziege anti-Kaninchen IgG	Cy2	Biomeda	1 : 100
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Biotin	Dianova	1 : 500
Ziege anti-Maus IgG	Alkalische Phosphatase	Dianova	1 : 200
Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	Biotin	Dianova	1 : 1000
Anti-Kaninchen IgG (Signal Select™)	Alkalische Phosphatase	BioSource	lt. Herstellerangaben
Avidin-Biotin-Complex (Vectastain® ABC-Kit Peroxidase Standard PK-4000)	Biotinylierte Meerrettich Peroxidase	Vector	lt. Herstellerangaben
ExtrAvidin	Cy3	Sigma	1 : 300
Streptavidin	Cy2	Amersham	1 : 500 / 1 : 1000

Lösungen / Chemikalien / Puffer

Substanz / Lösung	Konzentration
Aceton	70 % bzw. 100 %
Acrylamid	40 %
Agarose	1 % bzw. 1,2 %
Ameisensäure	70 % bzw. 85 %
Ammoniumazetat	4 M
Ammoniumpersulfat	10 %
Aqua deion. *)	
β A ₄₀ humanes, lyophilisiertes, synthetisches Peptid, Signal Select™, BioSource	
β A ₄₂ humanes, lyophilisiertes, synthetisches Peptid, Signal Select™, BioSource	
Bovine Albumin-Fraktion IV (BSA), Merck	1 % bis 2 %
Chloroform	20 %
Chloroform : Isoamylalkohol	50 : 1
Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat), Merck	0,1 %
3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Sigma	5 mg/10 ml
Diethylether	99 %
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	0,1 %
Dithiothreitol (DTT)	100 mM
DNA-Extraktionspuffer (Tail-buffer, Mausschwanz-Puffer), 1 x	
▪ Tris-HCl-Puffer, pH 8,0	50 mM
▪ Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	100 mM
▪ Natriumchlorid (NaCl)	100 mM
▪ SDS	1 %
DNA-Ladepuffer (Loading Dye Solution, GIBCO BRL); 6 x	
▪ Glycerol	50 %
▪ Tris-HCl-Puffer (pH 7,5)	60 mM
▪ NaCl	120 mM
▪ EDTA	0,6 mM
▪ Bromphenolblau	0,3 %
DNA-Leiter GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas	0,1 mg DNA/ml
DNase (RNase-frei), BD PharMingen, Katalog-Nr. 556131	1 U/ μ l
D (+)-Saccharose	30 %
Eiweißglyzerin, Hollborn	
Entellan® auf Toluolbasis, Merck	
Ethanol	90 % bzw. 100 %
Ethidiumbromid-Lösung	1 μ g/ml
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	20 mM
Gelatine, Merck	1 %
Glutardialdehyd, Merck	25 %
Glycerin-Gelatine, Hollborn	
Harnstoff	48 %

Substanz / Lösung	Konzentration
Hefe-t-RNA, BD PharMingen	2 mg/ml
Hybridisierungspuffer (RNase- und DNase-frei), 1 x, BD PharMingen	
▪ Formamid	80 %
▪ EDTA	1 mM
▪ NaCl	400 mM
▪ Piperazin-N,N-Bisethansulfonsäure (PIPES), pH 6,7	40 mM
<i>In-vitro</i> -Transkriptionspuffer, 5 x, BD PharMingen	
▪ Tris-HCl, pH 7,9	200 mM
▪ Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	30 mM
▪ Spermidin	10 mM
▪ NaCl	50 mM
Isopropylalkohol	50 %
Ketamin (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn)	80 µl/20 g Körpergewicht
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$, Fermentas GmbH	25 mM
Natriumazid, NaN_3 , Sigma	0,1 mg/ml
3-N-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS), 10 x	
▪ MOPS	0,2 M
▪ Natriumazetat, $C_2H_3NaO_2$	0,05 M
▪ EDTA	10 mM
▪ Ad 1000 ml DEPC-Wasser	
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	2 %
Nukleotid-Mix (<i>In-vitro</i> -Transkription), BD PharMingen	GAC : je 2,75 mM; U : 61 µM
Nukleotid-Mix (PCR), Fermentas GmbH	GACT : je 10 mM
Paraformaldehyd, Merck	4 %
PBS (phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4, 1 x	
▪ Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$)	7 mM
▪ Dinatriummonohydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$)	3 mM
▪ NaCl	0,14 M
PCR-Reaktionspuffer, Finnzymes, 10 x	
▪ Tris-HCl-Puffer (1 x), pH 8,8	10 mM
▪ Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	1,5 mM
▪ Kaliumchlorid (KCl)	50 mM
▪ Triton X-100	0,1 %
Pefabloc sc (4-2-Aminoethylbenzensulfonylfluorid = AEBSF; Serinprotease-Inhibitor), Roche, Mannheim	1 mM
Phenol, pH 8, Tris-saturiert	25 %
Probenpuffer für RNA-Elektrophorese (analytisch, RNase Protection Assay), BD PharMingen	
▪ Formamid	80 %
▪ EDTA, pH 8,0	1 mM
▪ Tris-Borat, pH 8,3	50 mM
▪ Xylenzanol	0,05 %
▪ Bromphenolblau	0,05 %

Substanz / Lösung	Konzentration
Probenpuffer für RNA-Elektrophorese (qualitativ, RNA-Extraktion)	
▪ Formamid	500 µl/ml
▪ MOPS (10 x)	100 µl/ml
▪ Formaldehyd-Lösung (37 %)	100 µl/ml
▪ DNA-Ladepuffer (6x)	150 µl/ml
Proteaseinhibitor complete™, Boehringer Mannheim	1 Tabl./50 ml Dilutionspuffer
Proteinase K, aus dem Pilz Tritirachium album, BD PharMingen	10 mg/ml
Proteinase-K-Puffer (RNase- und DNase-frei), BD PharMingen	
▪ SDS in deionisiertem Wasser	4 %
Radionukleotid [α -32P]UTP, Amersham Biosciences	Volumenaktivität: 10 mCi/ml
Rekonstitutionspuffer (für ELISA), pH 9,0	
▪ Natriumbikarbonat, NaHCO ₃	55 mM
RNase-A+T1-Mix	A: 80 ng/µl; T1: 250 U/µl
RNase-Inhibitor RNasin™, BD PharMingen	40 U/µl
RNase-Puffer (RNase- und DNase-frei), pH 7,5, 1 x, BD PharMingen	
▪ Tris	10 mM
▪ NaCl	300 mM
▪ EDTA	5 mM
SDS (sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat)	2 %
Substrat (Fluoreszenz) für Alkalische Phosphatase (Signal Select™, BioSource)	0,6 mg/ml
TAE-Puffer (Tris-Acetat/EDTA-Puffer), pH 8,5, 50 x	
▪ Trisacetat, C ₆ H ₁₅ NO ₅	10 mM
▪ EDTA, pH 8,0	0,5 M
Taq DNA Polymerase, Fermentas GmbH	1 U/µl bzw. 5 U/µl
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer), pH 8,3, 10 x	
▪ Tris	0,89 M
▪ Borsäure	0,89 M
▪ EDTA	20 mM
TBS (Tris buffered saline, Tris gepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4, 1 x	
▪ Tris-HCl-Puffer	10 mM
▪ NaCl	15 mM
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	0,06 %
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer), pH 8,0, 10 x	
▪ Tris	100 mM
▪ EDTA	10 mM
Thioflavin S, Practical Grade, Sigma	1 %
Tissue-Tek®, SAKURA, Finetek Europe B.V.	
Toluol	99,5 %
Tris (Trishydroxymethylaminomethan), C ₄ H ₁₁ NO ₃	
Tris-HCl-Puffer, pH 7,4	50 mM
Tris-Puffer, pH 11,0	1 M
TRIzol® Reagent, Invitrogen	1 ml/100 mg Hirngewebe

Substanz / Lösung	Konzentration
T7 RNA Polymerase, BD PharMingen	20 U/μl
Wasserstoffperoxid 30 %	1 %
Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer)	20 μl/20 g Körpergewicht
Ziegennormalserum, Dianova	5 %

*) Aqua deion.: Zur Gewinnung von deionisiertem Wasser wurde das Reinstwassersystem „arium® 611 VF“ der Firma Sartorius AG, Göttingen verwendet.

Anhang II: Histometrische Auswertung

Tab. 4.3.1: Legende Kategorien für CD ₄ - und CD ₈ -T-Zellen sowie für Mikrogliazellen:									
Kategorie	CD ₄ -/CD ₈ -T-Zellen					Mikrogliazellen			
0	Keine CD ₄ -/CD ₈ -Infiltrate					Ausschließlich ruhende Mikroglia			
1	Geringgradige CD ₄ -/CD ₈ -Infiltrate					Ruhende und vereinzelt auch aktivierte Mikroglia			
2	Mittelgradige CD ₄ -/CD ₈ -Infiltrate					Überwiegend aktivierte Mikroglia			
3	Hochgradige CD ₄ -/CD ₈ -Infiltrate					Hochgradige mikrogliale Aktivierung			

Infektionszeitpunkt 11 Monate									
Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD ₄ - Kategorie	CD ₈ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier 9-1 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	0,39	4,50	5,00
		2	0	0	0	0	0,02	1,50	5,00
		3	0	0	0	0		2,50	3,00
		4	0	0	0	0	1,17	4,50	2,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	1,10	11,00	5,00
		2	0	0	0	0	0,95	1,50	2,00
		3	0	0	0	0		1,00	1,50
		4	0	0	0	0	0,36	10,50	4,50
		5	0	0	0	0	0,10	0,50	1,50
		6	0	0	0	0		0,50	0,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	0,95	7,50	4,50
		2	0	0	0	0	0,60	4,50	2,50
		3	0	0	0	0		8,50	0,50
		4	0	0	0	0	0,70	8,50	3,50
		5	0	0	0	0	/	8,00	1,00
		6	0	0	0	0	/	1,00	2,50
Kontroll- tier 9-5 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	0,22	4,50	4,00
		2	0	0	0	0	0,05	0,00	2,00
		3	0	0	0	0		1,00	2,50
		4	0	0	0	0	0,01	1,00	3,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	0,33	2,00	3,00
		2	0	0	0	0	0,20	3,00	2,50
		3	0	0	0	0		0,50	0,50
		4	0	0	0	0	0,05	2,50	4,00
		5	0	0	0	0	0,33	0,00	2,00
		6	0	0	0	0		0,00	1,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	0,10	2,00	2,00
		2	0	0	0	0	0,20	1,00	1,00
		3	0	0	0	0		1,00	0,00
		4	0	0	0	0	2,70	3,00	0,50
		5	0	0	0	0	/	1,50	2,00
		6	0	0	0	0	/	0,00	2,00

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD ₄ - Kategorie	CD ₈ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier 21-2 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	0,30	11,50	16,00
		2	0	0	0	0	0,17	2,00	8,00
		3	0	0	0	0		0,00	4,00
		4	0	0	0	0	0,12	0,00	4,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	0,40	9,50	8,50
		2	0	0	0	0	0,20	0,00	4,50
		3	0	0	0	0		6,00	5,00
		4	0	0	0	0	0,06	2,00	10,50
		5	0	0	0	0	0,09	1,00	0,00
		6	0	0	0	0		0,00	0,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	0,16	9,50	8,00
		2	0	0	0	0	0,34	0,50	3,00
		3	0	0	0	0		0,50	4,00
		4	0	0	0	0	0,07	1,00	8,00
		5	0	0	0	0	/	2,00	3,00
		6	0	0	0	0	/	1,50	3,00
Kontroll- tier 21-6 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	0,46	25,00	5,50
		2	0	0	0	0	2,12	0,00	3,00
		3	0	0	0	0		0,50	1,50
		4	0	0	0	0	0,01	0,00	3,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	2,90	21,00	3,00
		2	0	0	0	0	2,90	4,00	1,00
		3	0	0	0	0		0,50	0,50
		4	0	0	0	0	0,10	6,50	2,50
		5	0	0	0	0	0,22	2,50	3,00
		6	0	0	0	0		0,00	0,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	0,94	23,50	2,00
		2	0	0	0	0	0,54	0,00	0,00
		3	0	0	0	0		1,00	1,00
		4	0	0	0	0	0,18	4,50	3,00
		5	0	0	0	0	/	6,00	9,50
		6	0	0	0	0	/	0,00	3,00
BDV-Tier 9-8 tg	Bregma 0,26 mm	1	69	1	NICHT AUSWERT- BAR	2	0,26	19,50	11,50
		2	39	1		1	0,19	0,00	4,50
		3	87	1		1		1,00	3,50
		4	64	3		2 bis 3	0,40	2,50	4,50
	Bregma -1,82 mm	1	37	1		1	0,22	6,50	7,00
		2	34	1		1	1,13	3,50	4,50
		3	56	2		1		8,50	2,00
		4	91	2		1	0,09	4,00	3,00
		5	67	3		3	0,17	2,50	1,00
		6	287	3		3		1,50	0,00
	Bregma -2,8 mm	1	Nicht auswert- bar	2		2	0,16	3,50	7,50
		2		1		1	0,77	3,50	2,00
		3		2		2		4,50	1,00
		4		2		2	0,07	3,50	2,00
		5		3		3	/	10,00	1,00
		6		3		3	/	4,50	2,00

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD ₄ - Kategorie	CD ₈ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
BDV-Tier 12-6 tg	Bregma 0,26 mm	1	92	1	NICHT AUSWERT- BAR	1 bis 2	0,10	1,00	7,00
		2	65	0		1	0,08	0,00	3,00
		3	65	0		2		0,50	2,00
		4	92	2		2	0,04	0,50	4,50
	Bregma -1,82 mm	1	68	2		1	0,10	1,00	5,50
		2	59	1		0 bis 1	0,10	1,00	3,00
		3	73	2		1 bis 2		0,50	0,50
		4	71	2		1 bis 2	0,07	0,50	3,50
		5	87	3		3	0,19	2,00	4,50
		6	335	1 bis 2		3		0,00	1,50
		1	84	2		1	0,15	2,00	4,00
		2	71	1		1		1,50	3,00
		3	88	2		1 bis 2		0,00	0,50
	Bregma -2,8 mm	4	77	2		1	0,62	5,50	1,50
		5	100	3		2	/	3,00	4,50
		6	368	3		2	/	0,00	3,50
BDV-Tier 22-4 tg	Bregma 0,26 mm	1	30	2	2	2	0,04	7,00	3,00
		2	19	1	1	1	0,33	0,00	2,50
		3	56	1	1	1		0,00	0,00
		4	38	2	1	2	0,01	2,50	5,00
	Bregma -1,82 mm	1	21	2	1	2	0,03	3,50	5,00
		2	15	1	1	1	0,25	0,50	4,00
		3	41	1	1	1		2,00	3,00
		4	61	1	1	1 bis 2	0,06	1,00	2,50
		5	34	3	3	3		1,00	3,50
		6	46	3	3	3	0,16	0,50	2,00
	Bregma -2,8 mm	1	14	2	1	2	0,11	2,50	3,00
		2	13	1 bis 2	1	2	0,06	0,50	0,50
		3	46	1 bis 2	1	2		2,00	0,50
		4	70	1 bis 2	2	2	0,25	4,50	1,00
		5	49	3	2	3	/	8,50	3,00
		6	52	3	3	3	/	0,00	0,50
BDV-Tier 22-6 tg	Bregma 0,26 mm	1	20	2	1	2	0,07	3,00	8,50
		2	27	1	1	1	0,02	0,00	3,00
		3	55	2	1	2		0,00	2,50
		4	41	3	2	2	0,06	0,00	4,00
	Bregma -1,82 mm	1	13	2	1	2	0,02	1,50	6,50
		2	52	1	1	1	0,12	2,00	2,00
		3	85	3	2	2		2,00	0,50
		4	100	3	2	2	0,19	11,00	3,50
		5	49	3	3	3	0,03	0,00	2,00
		6	31	3	3	3		0,00	1,00
	Bregma -2,8 mm	1	10	2	2	2	0,12	2,00	2,50
		2	136	3	2	2	0,02	1,50	1,00
		3	23	3	1	/		2,50	0,00
		4	83	3	1	/	0,04	7,00	1,50
		5	60	3	3	3	/	3,00	5,50
		6	133	3	3	3	/	0,00	4,00

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4- Kategorie	CD8- Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
BDV-Tier 22-7 tg	Bregma 0,26 mm	1	56	2	1	2	0,08	9,00	12,00
		2	53	1	2	1	0,17	2,00	12,50
		3	177	1	1	1		1,50	1,50
		4	160	2	2	2	0,19	5,00	8,50
	Bregma -1,82 mm	1	48	2	1	2	0,74	10,00	7,00
		2	37	2	1	0 bis 1	0,28	2,50	4,50
		3	84	3	1 bis 2	2		1,50	2,00
		4	154	3	2 bis 3	/	0,17	5,00	7,50
		5	67	3	3	3	0,11	2,00	0,50
		6	147	3	3	3		1,00	0,50
	Bregma -2,8 mm	1	33	2	2	2	0,39	17,50	4,00
		2	54	2	1 bis 2	0 bis 1	0,15	3,50	0,50
		3	67	3	2	3		0,00	0,50
		4	140	3	2	3	0,40	4,00	3,50
		5	103	3	3	3	/	13,50	13,50
		6	160	3	3	3	/	1,00	8,00

Infektionszeitpunkt 13,5 Monate									
Kontroll- tier XIII-36 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	1,90	7,50	10,50
		2	0	0	0	0	5,31	6,50	6,50
		3	0	0	0	0		5,00	3,00
		4	0	0	0	0	1,90	3,50	6,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	1,40	7,50	3,00
		2	0	0	0	0	7,18	17,50	3,50
		3	0	0	0	0		5,50	2,00
		4	0	0	0	0	2,56	29,50	4,00
		5	0	0	0	0	0,38	5,00	0,00
		6	0	0	0	0		4,00	0,50
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	3,07	25,00	1,00
		2	0	0	0	0	6,04	4,50	1,00
		3	0	0	0	0		11,00	0,50
		4	0	0	0	0	1,21	13,00	2,00
		5	0	0	0	0	/	21,50	3,50
		6	0	0	0	0	/	2,00	0,00

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4- Kategorie	CD8- Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier XIII-76 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	0,81	23,50	7,50
		2	0	0	0	0	1,40	12,50	9,50
		3	0	0	0	0		6,50	0,00
		4	0	0	0	0	0,03	1,00	4,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	1,90	21,50	5,00
		2	0	0	0	0	0,82	12,50	3,50
		3	0	0	0	0		12,50	20
		4	0	0	0	0	5,40	41,00	1,00
		5	0	0	0	0	0,18	21,00	2,50
		6	0	0	0	0		13,50	0,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	0,56	25,00	2,50
		2	0	0	0	0	2,60	21,00	2,00
		3	0	0	0	0		10,50	0,00
		4	0	0	0	0	7,05	33,00	1,50
		5	0	0	0	0	/	39,50	5,00
		6	0	0	0	0	/	11,00	0,50
Kontroll- tier XIII-85 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	1,30	27,00	5,00
		2	0	0	0	0	4,83	4,00	3,50
		3	0	0	0	0		3,00	2,50
		4	0	0	0	0	0,15	0,50	3,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	1,53	33,50	3,00
		2	0	0	0	0	4,74	22,50	3,00
		3	0	0	0	0		9,00	2,00
		4	0	0	0	0	2,03	36,00	7,00
		5	0	0	0	0	0,72	6,50	2,00
		6	0	0	0	0		1,00	2,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	2,16	55,00	1,50
		2	0	0	0	0	4,12	15,50	4,50
		3	0	0	0	0		21,50	0,00
		4	0	0	0	0	3,75	8,50	3,00
		5	0	0	0	0	/	12,50	1,50
		6	0	0	0	0	/	11,00	2,00
Kontroll- tier XIII-87 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	5,07	12,00	6,50
		2	0	0	0	0	3,52	8,50	5,50
		3	0	0	0	0		5,00	3,00
		4	0	0	0	0	0,41	1,50	2,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	4,63	42,50	4,50
		2	0	0	0	0	4,13	41,50	3,00
		3	0	0	0	0		13,00	1,50
		4	0	0	0	0	4,03	19,00	6,00
		5	0	0	0	0	3,09	22,50	2,50
		6	0	0	0	0		4,50	0,50
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	2,30	38,50	6,00
		2	0	0	0	0	0,89	39,50	2,50
		3	0	0	0	0		22,00	0,00
		4	0	0	0	0	0,31	24,50	2,00
		5	0	0	0	0	/	27,00	4,50
		6	0	0	0	0	/	8,00	0,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4 ⁺ - Kategorie	CD8 ⁺ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ ⁺ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier XIII-89 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	5,70	11,00	5,50
		2	0	0	0	0	2,25	5,50	3,00
		3	0	0	0	0		5,50	3,00
		4	0	0	0	0	0,24	2,50	4,00
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	8,95	22,50	3,50
		2	0	0	0	0	2,90	10,00	3,50
		3	0	0	0	0		12,50	0,00
		4	0	0	0	0	5,72	39,50	3,50
		5	0	0	0	0	5,73	19,50	4,50
		6	0	0	0	0		1,00	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	4,30	12,00	1,50
		2	0	0	0	0	4,38	15,00	0,00
		3	0	0	0	0		6,50	0,50
		4	0	0	0	0	4,58	26,50	2,50
		5	0	0	0	0	/	31,50	2,00
		6	0	0	0	0	/	2,50	1,50
BDV-Tier XIII-77 tg	Bregma 0,26 mm	1	10	0	0	1 bis 2	1,26	3,00	2,00
		2	5	0	0	1 bis 2	0,99	1,00	8,50
		3	23	1	0	2		2,00	3,00
		4	30	1	0	1	0,14	3,00	7,50
	Bregma -1,82 mm	1	29	0 bis 1	0	0 bis 1	0,77	12,00	2,50
		2	20	0 bis 1	0	0 bis 1	0,22	5,00	9,00
		3	35	0 bis 1	0	1 bis 2		8,00	3,00
		4	47	0 bis 1	0	0	2,65	14,50	8,00
		5	29	0	0	1 bis 2	0,15	2,50	1,50
		6	186	0 bis 1	0	1 bis 2		1,00	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	23	0 bis 1	0	1	0,95	20,00	7,50
		2	22	0 bis 1	0	0	0,78	14,00	4,00
		3	42	0 bis 1	0	1		10,00	7,50
		4	62	0	0	0	2,46	13,50	8,00
		5	36	0	0	0	/	13,50	3,00
		6	125	0	0	1	/	1,00	2,50
BDV-Tier XIII-93 tg	Bregma 0,26 mm	1	25	3	0	2	0,72	15,50	8,50
		2	9	2	0	1	0,36	2,00	7,00
		3	20	3	1	2		3,50	2,50
		4	45	3	0	3	1,25	1,50	7,50
	Bregma -1,82 mm	1	44	2	0	2	2,74	9,50	7,00
		2	39	2	0	1	1,26	6,00	3,00
		3	10	3	1 bis 2	3		11,00	1,00
		4	34	3	0	2	4,20	14,50	6,50
		5	10	3	3	3	0,94	2,00	3,00
		6	52	3	3	3		6,50	4,00
	Bregma -2,8 mm	1	44	2	0	2	3,54	26,50	8,50
		2	36	3	1 bis 2	1	2,19	6,00	3,50
		3	11	3	1	3		7,00	1,50
		4	26	3	0	2	1,55	17,50	4,00
		5	113	3	2	2	/	14,00	7,50
		6	8	3	2	2	/	5,00	9,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4 ⁺ - Kategorie	CD8 ⁺ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
BDV-Tier XIV-55 tg	Bregma 0,26 mm	1	25	0	0	0	0,85	17,50	6,50
		2	29	0	0	0	1,31	13,50	4,50
		3	20	0	0	0		5,50	3,00
		4	20	0	1	0	0,18	0,50	3,00
	Bregma -1,82 mm	1	21	0	0	1	0,63	13,00	4,50
		2	18	0	0	0	0,32	5,50	7,00
		3	33	1	1	1		5,00	6,00
		4	39	0	0	0	3,83	22,00	3,00
		5	15	1	1	1	0,16	3,50	0,00
		6	246	1	1	1		4,00	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	15	0	0	1	0,27	18,00	5,00
		2	23	0	0	0	0,56	11,50	4,00
		3	29	1	1	1		6,00	4,50
		4	35	0	0	0	2,24	27,50	0,00
		5	17	1	1	1	/	3,00	0,00
		6	239	1	1	1	/	6,00	2,00
BDV-Tier XIV-67 tg	Bregma 0,26 mm	1	29	1	0	1	3,73	21,50	7,50
		2	31	2	0	0	0,73	4,50	5,50
		3	21	2	0	1		4,50	1,00
		4	28	2	0	2	0,53	0,00	5,00
	Bregma -1,82 mm	1	40	1	0	0	5,06	28,00	8,50
		2	35	1 bis 2	0	0	1,46	22,50	6,00
		3	27	2 bis 3	0	1 bis 2		10,50	1,50
		4	22	3	0	1 bis 2	2,19	18,50	5,50
		5	14	3	1	2	0,14	0,00	2,50
		6	73	3	0 bis 1	2		2,00	2,00
	Bregma -2,8 mm	1	36	1	0	1	2,46	28,00	8,50
		2	29	1 bis 2	0	0	1,69	3,00	3,50
		3	20	2	0	1 bis 2		17,00	2,50
		4	24	2 bis 3	0	1 bis 2	4,37	19,50	3,00
		5	24	2	2	2	/	10,00	4,50
		6	/	3	0	1 bis 2	/	3,00	2,00
BDV-Tier XIV-81 tg	Bregma 0,26 mm	1	36	0	0	0	0,54	10,00	6,00
		2	26	0 bis 1	0	0	1,13	2,00	7,50
		3	36	0 bis 1	1	0		5,00	3,50
		4	34	0	0	0	0,14	2,50	3,50
	Bregma -1,82 mm	1	51	0	0	0	1,34	18,50	6,00
		2	45	0	0	0	1,32	19,00	2,50
		3	45	0 bis 1	0	1		13,00	1,50
		4	58	0 bis 1	0	0	2,35	37,50	2,50
		5	33	1	0	1	0,30	8,50	2,50
		6	211	1	0	1		3,50	3,50
	Bregma -2,8 mm	1	51	0	0	0	2,78	25,00	8,50
		2	42	0	0	0	0,77	3,00	3,50
		3	51	0	0	0 bis 1		4,50	0,00
		4	53	0	0	0	3,16	37,50	3,00
		5	22	0 bis 1	0	0 bis 1	/	3,50	3,50
		6	184	1	0	0 bis 1	/	1,00	4,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Infektionszeitpunkt 18 Monate									
Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD ₄ - Kategorie	CD ₈ - Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier III-23 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	10,00	45,00	19,50
		2	0	0	0	0	13,80	13,00	20,50
		3	0	0	0	0		7,00	4,00
		4	0	0	0	0	5,30	39,50	4,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	13,30	37,00	9,50
		2	0	0	0	0	10,60	11,50	6,50
		3	0	0	0	0		12,00	3,50
		4	0	0	0	0	14,40	68,00	5,00
		5	0	0	0	0	11,30	22,50	1,00
		6	0	0	0	0		10,50	1,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	14,50	29,00	9,00
		2	0	0	0	0	17,50	33,50	6,50
		3	0	0	0	0		9,00	2,50
		4	0	0	0	0	17,80	33,50	6,50
		5	0	0	0	0	/	61,50	0,50
		6	0	0	0	0	/	11,50	2,00
Kontroll- tier XIII-13 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	9,90	53,50	9,50
		2	0	0	0	0	13,10	16,00	11,00
		3	0	0	0	0		22,50	2,50
		4	0	0	0	0	6,90	18,00	3,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	10,80	60,00	7,50
		2	0	0	0	0	9,00	24,50	5,00
		3	0	0	0	0		33,00	1,00
		4	0	0	0	0	16,70	47,00	10,00
		5	0	0	0	0	9,20	39,00	1,50
		6	0	0	0	0		19,50	2,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	7,30	58,50	5,00
		2	0	0	0	0	20,00	39,50	3,50
		3	0	0	0	0		15,50	0,50
		4	0	0	0	0	15,90	44,00	8,00
		5	0	0	0	0	/	99,00	4,50
		6	0	0	0	0	/	16,00	2,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4- Kategorie	CD8- Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
Kontroll- tier XIII-14 tg	Bregma 0,26 mm	1	0	0	0	0	5,90	18,50	8,00
		2	0	0	0	0	6,60	2,00	9,50
		3	0	0	0	0		1,00	5,00
		4	0	0	0	0	5,00	11,00	2,50
	Bregma -1,82 mm	1	0	0	0	0	7,40	17,00	7,50
		2	0	0	0	0	4,60	2,00	3,50
		3	0	0	0	0		6,00	0,00
		4	0	0	0	0	12,20	42,00	4,50
		5	0	0	0	0	8,80	15,50	2,00
		6	0	0	0	0		3,50	2,00
	Bregma -2,8 mm	1	0	0	0	0	7,70	55,00	8,00
		2	0	0	0	0	8,00	9,00	2,50
		3	0	0	0	0		5,00	2,50
		4	0	0	0	0	5,80	31,50	3,00
		5	0	0	0	0	/	14,50	2,50
		6	0	0	0	0	/	3,50	1,50
BDV-Tier 3-6 tg	Bregma 0,26 mm	1	14	2	2	3	7,30	60,00	17,50
		2	19	2	1	3	15,30	29,50	8,50
		3	24	3	3	3		13,50	1,50
		4	18	3	2	3	5,00	12,00	8,00
	Bregma -1,82 mm	1	10	3	2	3	7,00	34,50	7,50
		2	11	3	2	3	6,00	27,50	7,50
		3	24	3	3	/		24,50	3,00
		4	27	3	3	/	5,40	40,00	6,50
		5	12	3	3	3	5,60	31,50	1,00
		6	162	3	3	3		11,00	3,00
	Bregma -2,8 mm	1	7	3	1	3	9,60	42,00	6,50
		2	85	3	2	3	19,90	8,00	2,00
		3	34	3	3	/		14,50	1,00
		4	33	3	3	/	12,10	43,00	4,50
		5	19	3	3	3	/	116,50	2,50
		6	19	3	3	3	/	17,00	8,00
BDV-Tier IV-38 tg	Bregma 0,26 mm	1	21	2	0 bis 1	2	25,60	54,50	16,50
		2	24	0 bis 1	0	0 bis 1	16,80	11,50	14,00
		3	58	0 bis 1	0 bis 1	0 bis 1		4,50	0,00
		4	36	0	2	1	18,50	7,00	7,00
	Bregma -1,82 mm	1	18	1	0	1	13,50	51,50	11,00
		2	25	0 bis 1	0	0 bis 1	13,70	46,00	15,00
		3	39	0 bis 1	0 bis 1	0 bis 1		11,00	2,50
		4	41	0 bis 1	0 bis 1	1	13,40	44,00	7,00
		5	37	2	1	2	14,40	35,50	2,50
		6	335	2	2	2		9,50	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	14	1	1	2	16,90	68,00	11,00
		2	10	1	0	1	18,20	18,00	8,00
		3	56	1	0	1		9,00	6,00
		4	42	1 bis 2	1 bis 2	1 bis 2	20,60	45,00	3,50
		5	64	2	0 bis 1	2	/	53,00	1,00
		6	202	2	1	2	/	6,50	2,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4- Kategorie	CD8- Kategorie	F4/80- Kategorie	BA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
BDV-Tier X-60 tg	Bregma 0,26 mm	1	15	2	1	2	12,50	31,50	25,50
		2	21	1	1	1	14,80	12,50	23,50
		3	52	1	1	1		4,50	4,50
		4	47	1 bis 2	1	1 bis 2	4,90	8,50	6,50
	Bregma -1,82 mm	1	19	1 bis 2	1	1 bis 2	6,40	25,00	16,50
		2	24	1	1	1	5,40	10,00	7,50
		3	41	1	2	1		8,00	3,50
		4	68	1	1	1	12,00	27,50	11,50
		5	80	2	2	1 bis 2	5,10	18,50	8,00
		6	183	2	2	1 bis 2		8,50	3,00
	Bregma -2,8 mm	1	12	1	0 bis 1	1	5,70	34,00	10,50
		2	10	1	0	1	10,30	13,50	8,00
		3	48	1	0 bis 1	1		7,50	5,50
		4	69	1	0	1	14,60	31,50	13,00
		5	57	1	1	1	/	30,00	9,50
		6	168	1	1	1	/	9,00	3,00
BDV-Tier X-57 tg	Bregma 0,26 mm	1	19	1	0	1	11,00	44,00	21,00
		2	7	0 bis 1	0	0 bis 1	13,70	1,00	10,50
		3	33	0 bis 1	0 bis 1	0 bis 1		8,00	3,50
		4	38	1	2	1	3,30	5,00	7,50
	Bregma -1,82 mm	1	19	0	0	1	11,10	45,00	12,00
		2	12	0	0	0 bis 1	11,00	29,00	4,00
		3	46	0 bis 1	0 bis 1	0 bis 1		21,50	5,00
		4	57	0 bis 1	0 bis 1	0 bis 1	14,14	39,00	7,00
		5	44	1	2	2	8,50	28,50	5,00
		6	330	1	2	2		8,50	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	13	1	0	1	17,30	35,50	13,50
		2	12	1	0	1	12,50	20,50	6,50
		3	42	1	0	0 bis 1		7,50	2,00
		4	85	1	0	0 bis 1	17,60	21,00	3,50
		5	10	2 bis 3	2	1 bis 2	/	50,00	14,50
		6	246	3	2	3	/	3,00	4,50
BDV-Tier XIV-62 tg	Bregma 0,26 mm	1	62	0	0 bis 1	1	7,00	18,00	20,50
		2	60	0	0	0	3,60	0,50	10,50
		3	68	0 bis 1	0	0		6,50	6,00
		4	77	0 bis 1	0	0 bis 1	2,50	2,50	4,50
	Bregma -1,82 mm	1	64	0	1	1	2,80	37,00	13,00
		2	52	0	1	0	5,00	4,00	8,00
		3	90	1	1	0		6,00	4,50
		4	104	1	1	1	3,60	33,50	9,00
		5	93	1	1	2	3,90	26,50	2,00
		6	416	1	0 bis 1	1 bis 2		10,00	7,00
	Bregma -2,8 mm	1	54	NICHT AUSWERT- BAR	NICHT AUSWERT- BAR	1	2,00	34,00	11,50
		2	60			0 bis 1	5,30	11,00	4,50
		3	87			0 bis 1		11,50	2,50
		4	111			0 bis 1	2,20	21,50	5,00
		5	109			0 bis 1	/	32,50	4,50
		6	380			1	/	2,00	6,50

Tabelle 4.3.1 wird fortgesetzt

Fortsetzung der Tabelle 4.3.1

Tier	Region	Areal	Bo18- pos. Zellen pro 10 ⁵ µm ²	CD4- Kategorie	CD8- Kategorie	F4/80- Kategorie	βA ₁₋₄₂ - Anteil in %	Thio-S-pos., parenchym. Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)	Thio-S-pos., vaskuläres Amyloid (Mittelwert aus Zweifach- zählung)
BDV-Tier XIV-65 tg	Bregma 0,26 mm	1	67	1	1	1	5,40	37,00	5,00
		2	80	1	0 bis 1	1	2,70	16,00	11,50
		3	68	1	0 bis 1	1		6,50	3,00
		4	87	1	0 bis 1	1	0,30	7,00	8,00
	Bregma -1,82 mm	1	62	1	0 bis 1	1	7,70	28,00	5,00
		2	59	1	1	0 bis 1	4,70	22,00	9,00
		3	91	2	0 bis 1	1		6,00	8,50
		4	81	2	1	0 bis 1	2,50	28,00	11,50
		5	88	2	1	2	1,80	32,00	4,00
		6	411	2	1	2		7,00	1,50
	Bregma -2,8 mm	1	78	NICHT AUSWERT- BAR	NICHT AUSWERT- BAR	1	7,70	24,00	7,50
		2	68			0 bis 1	3,60	18,00	4,50
		3	96			1 bis 2		4,00	4,50
		4	119			0 bis 1	3,00	22,50	11,50
		5	99			2	/	35,00	2,00
		6	341			2	/	3,50	2,00

Anhang III: Statistische Datenverarbeitung und Diagramme

Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk; Tabelle zu Punkt 3.4 auf S. 45

Tab. 3.4.A: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung (11 Monate)

Normalverteilung liegt vor, wenn $p < 0,05$ (rosa unterlegt), daher liegen bei den durchgeführten Untersuchungen überwiegend deutliche Abweichungen von der Normalverteilung vor.

Parameter			Signifikanz nach Shapiro-Wilk (p-Werte):		
Altersgruppe:	Bregma-Ebene und Areal:	Tiergruppe:	βA_{1-42} -Immunhistochemie:	Parenchym. Thioflavin-S:	Vaskuläres Thioflavin-S:
11 Monate	0,26 mm Areal 1	Kontrollen	0,928	0,169	0,026
		BDV	0,061	0,451	0,598
	0,26 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,007	0,538	0,262
		BDV	0,863	0,050	0,500
	0,26 mm Areal 4	Kontrollen	0,011	0,066	0,406
		BDV	0,176	0,547	0,018
	0,26mm Gesamt	Kontrollen	0,630	0,524	0,072
		BDV	0,401	0,491	0,774
	– 1,82 mm Areal 1	Kontrollen	0,156	0,821	0,189
		BDV	0,038	0,496	0,254
	– 1,82 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,110	0,952	0,189
		BDV	0,013	0,053	0,120
	– 1,82 mm Areal 4	Kontrollen	0,038	0,418	0,577
		BDV	0,205	0,364	0,025
	– 1,82 mm Areal 5+6	Kontrollen	0,374	0,572	0,062
		BDV	0,337	0,985	0,203
	– 1,82 mm Gesamt	Kontrollen	0,191	0,998	0,083
		BDV	0,128	0,755	0,998
	– 2,8 mm Areal 1	Kontrollen	0,053	0,476	0,233
		BDV	0,262	0,001	0,140
	– 2,8 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,470	0,009	0,161
		BDV	0,014	0,345	0,025
	– 2,8 mm Areal 4	Kontrollen	0,101	0,813	0,641
		BDV	0,600	0,656	0,223
	– 2,8 mm Gesamt	Kontrollen	0,952	0,126	0,429
		BDV	0,418	0,203	0,390
	Gesamt-Hirn 11 Monate	Kontrollen	0,909	0,960	0,067
		BDV	0,639	0,849	0,601

Tab. 3.4.B: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung (13,5 Monate)

Normalverteilung liegt vor, wenn $p < 0,05$ (rosa unterlegt), daher liegen bei den durchgeführten Untersuchungen überwiegend deutliche Abweichungen von der Normalverteilung vor.

Parameter			Signifikanz nach Shapiro-Wilk (p-Werte):		
Altersgruppe:	Bregma-Ebene und Areal:	Tiergruppe:	βA_{1-42} -Immunhistochemie:	Parenchym. Thioflavin-S:	Vaskuläres Thioflavin-S:
13,5 Monate	0,26 mm Areal 1	Kontrollen	0,182	0,306	0,417
		BDV	0,019	0,833	0,345
	0,26 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,684	0,805	0,069
		BDV	0,838	0,259	0,556
	0,26 mm Areal 4	Kontrollen	0,015	0,787	0,334
		BDV	0,036	0,692	0,212
	0,26 mm Gesamt	Kontrollen	0,129	0,420	0,605
		BDV	0,012	0,967	0,717
	– 1,82 mm Areal 1	Kontrollen	0,078	0,905	0,254
		BDV	0,211	0,331	0,978
	– 1,82 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,987	0,030	0,314
		BDV	0,083	0,162	0,212
	– 1,82 mm Areal 4	Kontrollen	0,448	0,394	0,855
		BDV	0,241	0,089	0,619
	– 1,82 mm Areal 5+6	Kontrollen	0,143	0,572	0,980
		BDV	0,007	0,802	0,898
	– 1,82 mm Gesamt	Kontrollen	0,333	0,848	0,641
		BDV	0,215	0,308	0,344
	– 2,8 mm Areal 1	Kontrollen	0,925	0,749	0,045
		BDV	0,655	0,480	0,014
	– 2,8 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,923	0,586	0,777
		BDV	0,214	0,957	0,783
	– 2,8 mm Areal 4	Kontrollen	0,809	0,659	0,814
		BDV	0,810	0,587	0,601
	– 2,8 mm Gesamt	Kontrollen	0,147	0,697	0,254
		BDV	0,651	0,420	0,135
	Gesamt-Hirn 13,5 Monate	Kontrollen	0,480	0,849	0,859
		BDV	0,353	0,734	0,631

Tab. 3.4.C: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung (18 Monate)

Normalverteilung liegt vor, wenn $p < 0,05$ (rosa unterlegt), daher liegen bei den durchgeführten Untersuchungen überwiegend deutliche Abweichungen von der Normalverteilung vor.

Parameter			Signifikanz nach Shapiro-Wilk (p-Werte):		
Altersgruppe:	Bregma-Ebene und Areal:	Tiergruppe:	BA ₁₋₄₂ -Immunhistochemie:	Parenchym. Thioflavin-S:	Vaskuläres Thioflavin-S:
18 Monate	0,26 mm Areal 1	Kontrollen	0,041	0,449	0,230
		BDV	0,062	0,942	0,333
	0,26 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,169	0,953	0,446
		BDV	0,043	0,586	0,056
	0,26 mm Areal 4	Kontrollen	0,281	0,454	1,000
		BDV	0,019	0,932	0,148
	0,26 mm Gesamt	Kontrollen	0,110	0,122	0,391
		BDV	0,367	0,865	0,482
	– 1,82 mm Areal 1	Kontrollen	0,832	0,923	0,000
		BDV	0,878	0,824	0,940
	– 1,82 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,497	0,594	0,747
		BDV	0,051	0,289	0,168
	– 1,82 mm Areal 4	Kontrollen	0,975	0,348	0,157
		BDV	0,157	0,464	0,091
	– 1,82 mm Areal 5+6	Kontrollen	0,286	0,682	0,463
		BDV	0,427	0,570	0,383
	– 1,82 mm Gesamt	Kontrollen	0,433	0,887	0,114
		BDV	0,386	0,553	0,967
	– 2,8 mm Areal 1	Kontrollen	0,094	0,208	0,463
		BDV	0,478	0,104	0,652
	– 2,8 mm Areal 2+3	Kontrollen	0,380	0,577	0,363
		BDV	0,617	0,095	0,634
	– 2,8 mm Areal 4	Kontrollen	0,282	0,286	0,567
		BDV	0,105	0,093	0,036
	– 2,8 mm Gesamt	Kontrollen	0,429	0,136	0,206
		BDV	0,320	0,289	0,790
	Gesamt-Hirn 18 Monate	Kontrollen	0,308	0,868	0,637
		BDV	0,58	0,369	0,374

Daten-Tabelle zu lokaler Mikroglia-Lymphozyten-Korrelation in den einzelnen Arealen
(siehe Tab. 4.2.1.1.i und Abb. 4.2.1.1.j auf S. 66)

** : Die Korrelation ist auf dem Niveau $p = 0,01$ signifikant (zweiseitig).
 * : Die Korrelation ist auf dem Niveau $p = 0,05$ signifikant (zweiseitig).
 / : Nicht auswertbar.

Nichtparametrischer Korrelations-Test nach SPEARMAN-RHO: Lokale Korrelation zwischen CD ₄ -T-Lymphozyten und Mikrogliazellen bei BDV- und Kontrolltieren												
Altersgruppe	Parameter	Bregma-Ebene 0,26 mm			Bregma-Ebene -1,82 mm			Bregma-Ebene -2,8 mm				
		Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4		
11 Monate (n = 9)	Korrelations- koeffizient	0,927**	0,800**	0,913**	0,948**	0,785*	0,979**	0,949**	0,916**	0,938**		
	p-Wert	0,000	0,010	0,001	0,000	0,012	0,000	0,000	0,001	0,001		
13,5 Monate (n = 10)	Korrelations- koeffizient	0,385	0,551	0,877**	0,385	0,877**	0,786**	0,323	0,877**	/		
	p-Wert	0,272	0,099	0,001	0,272	0,001	0,007	0,363	0,001	/		
18 Monate (n = 9)	Korrelations- koeffizient	0,773*	/	0,742*	0,777*	/	0,333	0,630	0,839*	0,447		
	p-Wert	0,015	/	0,022	0,014	/	0,420	0,129	0,018	0,374		

Tab. 4.2.1.2.b: Median-Vergleich des prozentualen β -Amyloid-Gehalts in drei untersuchten Hirn-regionen zwischen Kontrolltieren und BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	0,35	0,11	0,07	0,75	0,58	0,08	0,16	0,55	0,42	0,44
Percentil 25 (Kontrollen):	0,24	0,03	0,01	0,35	0,20	0,05	0,09	0,12	0,23	0,10
Percentil 50 (Kontrollen):	0,35	0,11	0,07	0,75	0,58	0,08	0,16	0,55	0,42	0,44
Percentil 75 (Kontrollen):	0,44	1,63	0,91	2,45	2,41	0,30	0,30	0,95	0,59	2,20
n (Kontrollen) = 4										
Median (BDV):	0,08	0,17	0,06	0,10	0,25	0,09	0,16	0,12	0,15	0,25
Percentil 25 (BDV):	0,06	0,05	0,03	0,03	0,11	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06
Percentil 50 (BDV):	0,08	0,17	0,06	0,10	0,25	0,09	0,16	0,12	0,15	0,25
Percentil 75 (BDV):	0,18	0,26	0,30	0,48	0,71	0,18	0,18	0,28	0,46	0,51
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,027	0,805	0,803	0,05	0,461	0,712	0,624	0,268	0,14	0,389

Daten-Tabelle zu Abb. 4.2.1.2.b auf S. 63

Tab. 4.2.1.2.c: Median-Vergleich des prozentualen β -Amyloid-Gehalts in drei untersuchten Hirn-regionen zwischen Kontrolltieren und BDV-Tieren in der Altersgruppe 13,5 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	1,90	3,52	0,24	1,90	4,13	4,03	0,72	2,30	4,12	3,75
Percentil 25 (Kontrollen):	1,06	1,83	0,09	1,47	1,86	2,30	0,28	1,36	1,75	0,76
Percentil 50 (Kontrollen):	1,90	3,52	0,24	1,90	4,13	4,03	0,72	2,30	4,12	3,75
Percentil 75 (Kontrollen):	5,39	5,07	1,16	6,79	5,96	5,56	4,41	3,69	5,21	5,82
n (Kontrollen) = 5										
Median (BDV):	0,85	0,99	0,18	1,34	1,26	2,65	0,16	2,46	0,78	2,46
Percentil 25 (BDV):	0,63	0,55	0,14	0,70	0,27	2,27	0,15	0,61	0,67	1,90
Percentil 50 (BDV):	0,85	0,99	0,18	1,34	1,26	2,65	0,16	2,46	0,78	2,46
Percentil 75 (BDV):	2,50	1,22	0,89	3,90	1,39	4,02	0,62	3,16	1,94	3,77
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,117	0,009	0,917	0,251	0,047	0,465	0,076	0,754	0,028	0,754

Daten-Tabelle zu Abb. 4.2.1.2.c auf S. 63

Tab. 4.2.1.2.e: Median-Vergleich des prozentualen β -Amyloid-Gehalts in drei untersuchten Hirnregionen zwischen Kontrolltieren und BDV-Tieren in der Altersgruppe 18 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	9,90	13,10	5,30	10,80	9,00	14,40	9,20	7,70	17,50	15,90
Percentil 25 (Kontrollen):	5,90	6,60	5,00	7,40	4,60	12,20	8,80	7,30	8,00	5,80
Percentil 50 (Kontrollen):	9,90	13,10	5,30	10,80	9,00	14,40	9,20	7,70	17,50	15,90
Percentil 75 (Kontrollen):	10,00	13,80	6,90	13,30	10,60	16,70	11,30	14,50	20,00	17,80
n (Kontrollen) = 3										
Median (BDV):	9,15	14,25	4,10	7,35	5,70	8,70	5,35	8,65	11,40	16,10
Percentil 25 (BDV):	6,60	3,38	1,95	5,50	4,93	3,33	3,38	4,78	4,88	2,80
Percentil 50 (BDV):	9,15	14,25	4,10	7,35	5,70	8,70	5,35	8,65	11,40	16,10
Percentil 75 (BDV):	15,78	15,68	8,38	11,70	11,68	13,59	9,98	17,00	18,63	20,73
n (BDV) = 6										
U-Test:	0,606	0,606	0,154	0,439	0,796	0,071	0,121	0,897	0,439	1,000

Daten-Tabelle zu Abb. 4.2.1.2.e auf S. 65

Tab. 4.2.1.2.g.A: Vergleich des β -Amyloid₁₋₄₂-Gehaltes zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene der Altersgruppe 11 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	1,09	1,71	1,96
Percentil 25 (Kontrollen):	0,36	0,79	0,81
Percentil 50 (Kontrollen):	1,09	1,71	1,96
Percentil 75 (Kontrollen):	2,34	5,22	2,81
n (Kontrollen) = 4			
Median (BDV):	0,38	0,50	0,79
Percentil 25 (BDV):	0,19	0,41	0,30
Percentil 50 (BDV):	0,38	0,50	0,79
Percentil 75 (BDV):	0,65	1,46	0,97
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,142	0,142	0,086

Daten-Tabelle A.) zu Abb. 4.2.1.2.g auf S. 66

Tab. 4.2.1.2.g.B: Vergleich des β -Amyloid₁₋₄₂-Gehaltes zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene der Altersgruppe 13,5 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	8,19	11,52	10,21
Percentil 25 (Kontrollen):	4,26	8,66	6,77
Percentil 50 (Kontrollen):	8,19	11,52	10,21
Percentil 75 (Kontrollen):	9,06	19,59	11,79
n (Kontrollen) = 5			
Median (BDV):	2,34	5,31	6,71
Percentil 25 (BDV):	2,07	4,37	3,63
Percentil 50 (BDV):	2,34	5,31	6,71
Percentil 75 (BDV):	3,69	9,00	7,90
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,076	0,047	0,076

Daten-Tabelle B.) zu Diagramm 4.2.1.2.g auf S. 66

Tab. 4.2.1.2.g.C: Vergleich des β -Amyloid₁₋₄₂-Gehaltes zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene der Altersgruppe 18 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	29,10	45,70	43,20
Percentil 25 (Kontrollen):	17,50	33,00	21,50
Percentil 50 (Kontrollen):	29,10	45,70	43,20
Percentil 75 (Kontrollen):	29,90	49,60	49,80
n (Kontrollen) = 3			
Median (BDV):	27,80	26,45	39,00
Percentil 25 (BDV):	11,93	16,35	13,10
Percentil 50 (BDV):	27,80	26,45	39,00
Percentil 75 (BDV):	39,38	47,31	51,88
n (BDV) = 6			
U-Test :	0,796	0,197	1,000

Daten-Tabelle C.) zu Diagramm 4.2.1.2.g auf S. 66

Tab. 4.2.3.1.c.A: Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β A-Plaques-Anzahl zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 11 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	13,25	21,75	20,25
Percentil 25 (Kontrollen):	8,13	10,63	8,13
Percentil 50 (Kontrollen):	13,25	21,70	20,25
Percentil 75 (Kontrollen):	22,50	32,13	29,00
n (Kontrollen) = 4			
Median (BDV):	9,50	16,50	13,00
Percentil 25 (BDV):	2,50	6,75	9,25
Percentil 50 (BDV):	9,50	16,50	13,00
Percentil 75 (BDV):	20,25	24,25	20,00
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,462	0,462	0,623

Daten-Tabelle A.) zu Abb. 4.2.3.1.c auf S. 69

Tab. 4.2.3.1.c.B: Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β A-Plaques-Anzahl zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 13,5 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	27,00	108,50	89,50
Percentil 25 (Kontrollen):	23,50	87,00	56,75
Percentil 50 (Kontrollen):	27,00	108,50	89,50
Percentil 75 (Kontrollen):	39,00	132,50	112,50
n (Kontrollen) = 5			
Median (BDV):	22,50	53,00	63,00
Percentil 25 (BDV):	14,25	46,25	57,25
Percentil 50 (BDV):	22,50	53,00	63,00
Percentil 75 (BDV):	33,75	90,75	68,75
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,295	0,028	0,347

Daten-Tabelle B.) zu Abb. 4.2.3.1.c auf S. 69

Tab. 4.2.3.1.c.C: Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β A-Plaques-Anzahl zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 18 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	104,50	161,50	105,00
Percentil 25 (Kontrollen):	32,50	86,00	100,50
Percentil 50 (Kontrollen):	104,50	161,50	105,00
Percentil 75 (Kontrollen):	110,00	223,00	157,50
n (Kontrollen) = 3			
Median (BDV):	62,25	146,00	85,50
Percentil 25 (BDV):	49,63	112,13	75,63
Percentil 50 (BDV):	62,25	146,00	85,50
Percentil 75 (BDV):	94,38	178,00	115,63
n (BDV) = 6			
U-Test:	0,606	1,000	0,197

Daten-Tabelle C.) zu Abb. 4.2.3.1.c auf S. 69

Tab. 4.2.3.1.e.A: Vergleich der Anzahl an Thioflavin-S-positiven, peri-vaskulären β A-Ablagerungen zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 11 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	14,25	13,75	8,50
Percentil 25 (Kontrollen):	11,88	10,75	4,13
Percentil 50 (Kontrollen):	14,25	13,75	8,50
Percentil 75 (Kontrollen):	27,88	28,75	20,00
n (Kontrollen) = 4			
Median (BDV):	18,00	18,50	8,50
Percentil 25 (BDV):	13,50	16,50	5,00
Percentil 50 (BDV):	18,00	18,50	8,50
Percentil 75 (BDV):	29,25	21,00	10,75
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,462	0,221	0,806

Daten-Tabelle A.) zu Abb. 4.2.3.1.e auf S. 71

Tab. 4.2.3.1.e.B: Vergleich der Anzahl an Thioflavin-S-positiven, peri-vaskulären β A-Ablagerungen zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 13,5 Monate;
 $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	17,50	16,50	6,00
Percentil 25 (Kontrollen):	14,75	13,50	4,50
Percentil 50 (Kontrollen):	17,50	16,50	6,00
Percentil 75 (Kontrollen):	23,75	18,50	9,75
n (Kontrollen) = 5			
Median (BDV):	20,50	24,50	17,50
Percentil 25 (BDV):	18,00	20,25	14,25
Percentil 50 (BDV):	20,50	24,50	17,50
Percentil 75 (BDV):	23,25	25,75	22,25
n (BDV) = 5			
U-Test:	0,530	0,016	0,009

Daten-Tabelle B.) zu Abb. 4.2.3.1.e auf S. 71

Tab. 4.2.3.1.e.C: Vergleich der Anzahl an Thioflavin-S-positiven, peri-vaskulären β A-Ablagerungen zwischen Kontroll- und BDV-Mäusen in den drei untersuchten Koronalebene in der Altersgruppe 18 Monate;
 $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -1,82 mm gesamt in %	Bregma-Ebene -2,80 mm gesamt in %
Median (Kontrollen):	26,50	26,50	17,00
Percentil 25 (Kontrollen):	20,50	19,50	16,00
Percentil 50 (Kontrollen):	26,50	26,50	17,00
Percentil 75 (Kontrollen):	48,50	27,00	24,50
n (Kontrollen) = 3			
Median (BDV):	39,50	39,50	26,75
Percentil 25 (BDV):	33,50	33,00	21,13
Percentil 50 (BDV):	39,50	39,50	26,75
Percentil 75 (BDV):	46,88	45,13	30,63
n (BDV) = 6			
U-Test:	0,302	0,020	0,197

Daten-Tabelle C.) zu Abb. 4.2.3.1.e auf S. 71

Tab. 4.2.3.1.f.A: Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate ohne signifikante Unterschiede; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	18,50	8,75	4,00	17,00	6,25	10,75	2,75	14,75	5,50	8,25
Percentil 25 (Kontrollen):	8,75	5,13	3,25	7,75	6,00	7,13	1,38	6,00	2,25	4,50
Percentil 50 (Kontrollen):	18,50	8,75	4,00	17,00	6,25	10,75	2,75	14,75	5,50	8,25
Percentil 75 (Kontrollen):	29,75	13,50	6,25	22,50	13,25	14,38	4,88	23,50	14,00	11,25
n (Kontrollen) = 4										
Median (BDV):	11,50	5,50	7,00	8,50	9,50	7,00	5,00	6,00	5,00	7,00
Percentil 25 (BDV):	9,00	4,00	4,50	7,25	5,75	3,75	3,50	5,00	4,00	5,50
Percentil 50 (BDV):	11,50	5,50	7,00	8,50	9,50	7,00	5,00	6,00	5,00	7,00
Percentil 75 (BDV):	26,00	13,25	10,50	15,25	14,50	13,50	7,50	14,75	8,00	8,00
n (BDV) = 5										
U-Test:	1,000	0,803	0,104	0,327	0,537	0,389	0,110	0,462	0,806	0,387

Gesamterfassung der perivaskulären und parenchymatösen, Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Signale in der Altersgruppe 11 Monate als Tabelle und als Diagramm (siehe Ergebnis-Teil, S. 71).

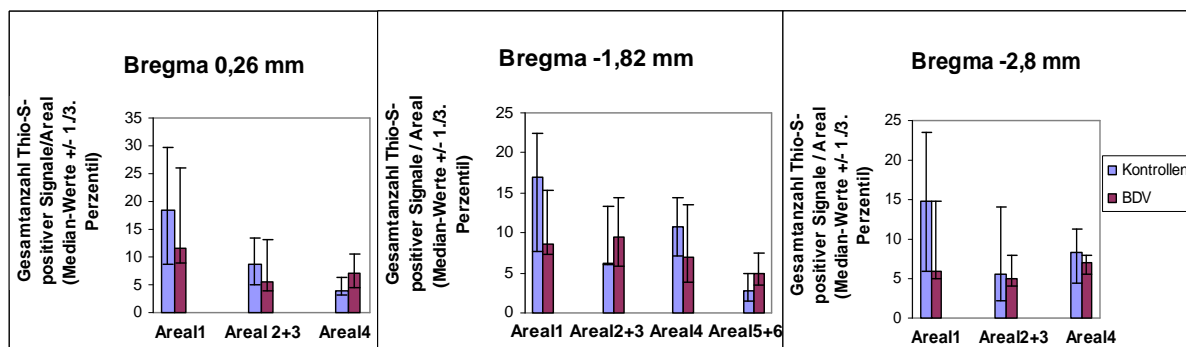


Abb. 4.2.3.1.f.A: Graphisch dargestellter Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate ohne signifikante Unterschiede.

Tab. 4.2.3.1.f.B: Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 13,5 Monate. In nur einem Areal signifikant geringerer Gesamtgehalt an Thio-S-positivem β A der BDV-Tiere gegenüber den Kontrolltieren; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	18,50	17,00	5,00	26,50	30,50	42,00	26,50	27,50	33,50	26,50
Percentil 25 (Kontrollen):	17,25	14,75	3,75	18,25	27,25	29,25	10,50	19,75	19,50	13,25
Percentil 50 (Kontrollen):	18,50	17,00	5,00	26,50	30,50	42,00	26,50	27,50	33,50	26,50
Percentil 75 (Kontrollen):	31,50	25,25	8,25	41,75	47,75	43,00	33,50	50,50	52,75	31,75
n (Kontrollen) = 5										
Median (BDV):	24,00	15,50	6,00	17,50	25,00	24,00	9,00	33,50	26,00	22,50
Percentil 25 (BDV):	10,50	14,75	4,25	15,50	22,25	21,75	6,50	25,25	14,50	21,50
Percentil 50 (BDV):	24,00	15,50	6,00	17,50	25,00	24,00	9,00	33,50	26,00	22,50
Percentil 75 (BDV):	26,50	22,25	9,75	30,50	38,25	32,50	16,75	35,75	30,75	34,00
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,463	0,602	0,599	0,295	0,251	0,036	0,075	1,000	0,346	0,753

Gesamterfassung der perivaskulären und parenchymatösen, Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Signale in der Altersgruppe 13,5 Monate als Tabelle und als Diagramm (siehe Ergebnis-Teil, S. 71).

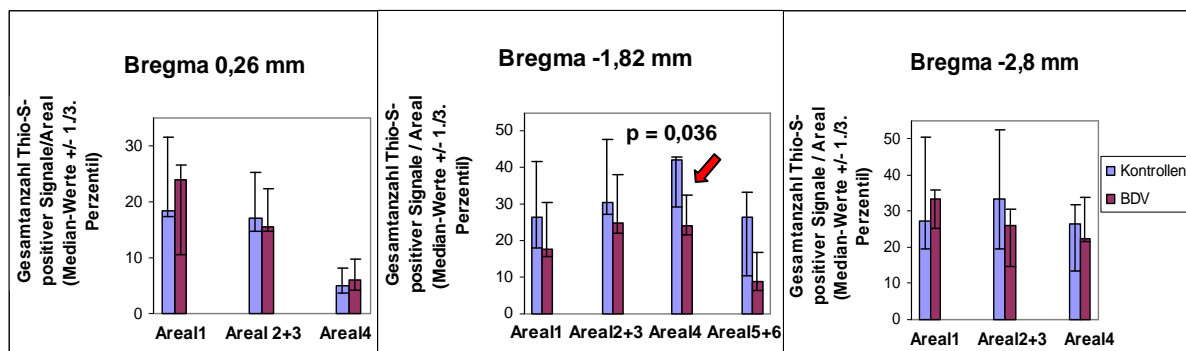


Abb. 4.2.3.1.f.B: Graphisch dargestellter Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 13,5 Monate. In nur einem Areal signifikant geringerer Gesamtgehalt an Thio-S-positivem β A der BDV-Tiere gegenüber den Kontrolltieren (roter Pfeil); $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.f.C: Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 18 Monate ohne signifikante Unterschiede; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	63,00	44,50	21,50	46,50	31,50	57,00	35,00	63,00	51,50	40,00
Percentil 25 (Kontrollen):	26,50	17,50	13,50	24,50	11,50	46,50	23,00	38,00	19,00	34,50
Percentil 50 (Kontrollen):	63,00	44,50	21,50	46,50	31,50	57,00	35,00	63,00	51,50	40,00
Percentil 75 (Kontrollen):	64,50	52,00	44,50	67,50	63,50	73,00	62,00	63,50	59,00	52,00
n (Kontrollen) = 3										
Median (BDV):	61,00	39,00	14,50	46,00	52,50	44,25	45,00	47,00	32,75	44,25
Percentil 25 (BDV):	41,13	23,38	11,13	39,13	27,38	39,38	42,13	41,25	28,50	26,00
Percentil 50 (BDV):	61,00	39,00	14,50	46,00	52,50	44,25	45,00	47,00	32,75	44,25
Percentil 75 (BDV):	72,63	47,00	16,25	58,38	65,50	47,63	47,13	56,50	37,63	47,75
n (BDV) = 6										
U-Test:	0,439	1,000	0,195	1,000	0,606	0,052	0,439	0,606	0,439	0,796

Gesamterfassung der perivaskulären und parenchymatösen, Thioflavin-S-positiven β -Amyloid-Signale in der Altersgruppe 18 Monate als Tabelle und als Diagramm (siehe Ergebnis-Teil, S. 71).

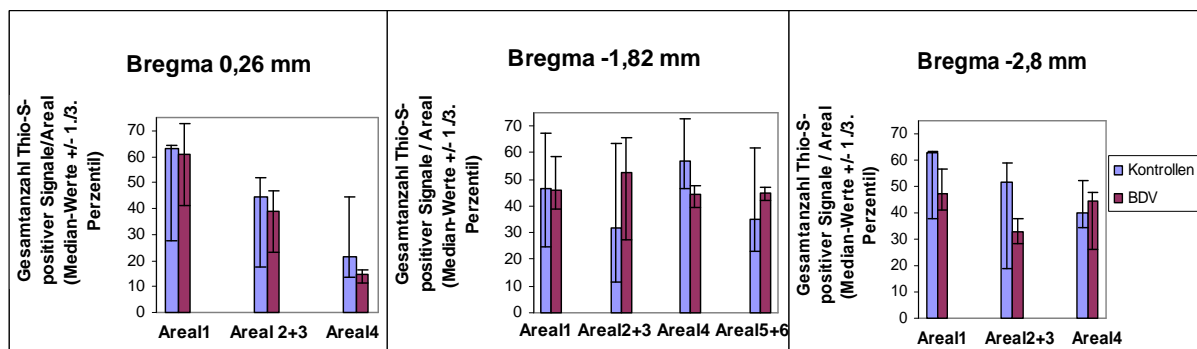


Abb. 4.2.3.1.f.C: Graphisch dargestellter Vergleich der zusammengefassten vaskulären und parenchymatösen, Thio-S-positiven β A-Signale zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 18 Monate ohne signifikante Unterschiede; $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.Ia: Median-Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β -Amyloid-Signale in drei untersuchten Hirnregionen zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 11 Monate;
 $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	8,00	1,50	0,50	10,25	4,00	4,50	1,00	8,50	1,50	3,75
Percentil 25 (Kontrollen):	4,50	0,63	0,00	3,88	2,75	2,13	0,25	3,38	1,00	1,50
Percentil 50 (Kontrollen):	8,00	1,50	0,50	10,25	4,00	4,50	1,00	8,50	1,50	3,75
Percentil 75 (Kontrollen):	21,63	3,50	3,63	18,50	5,63	9,50	2,13	20,00	10,25	7,50
n (Kontrollen) = 4										
Median (BDV):	7,00	0,50	2,50	3,50	4,00	4,00	2,00	2,50	3,50	4,50
Percentil 25 (BDV):	2,00	0,00	0,25	1,25	2,00	0,75	0,75	2,00	2,00	3,75
Percentil 50 (BDV):	7,00	0,50	2,50	3,50	4,00	4,00	2,00	2,50	3,50	4,50
Percentil 75 (BDV):	14,25	2,25	3,75	8,25	8,00	8,00	3,50	10,50	6,00	6,25
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,461	0,215	0,453	0,142	0,711	0,624	0,266	0,319	0,325	0,539

Daten-Tabelle 4.2.3.1.Ia: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 11 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69)

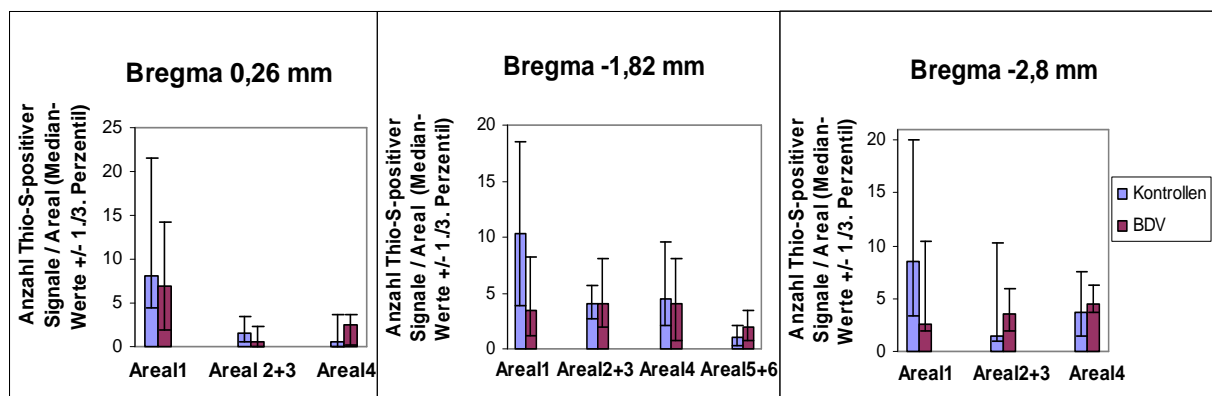


Abb. 4.2.3.1.Ia: Thioflavin-S-positiv, parenchymatöse β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 11 Monate

Bereits in dieser Altersgruppe war eine Tendenz zur Verringerung des parenchymalen β -Amyloid-Gehaltes in den Hirnregionen der BDV-infizierten Tiere erkennbar. Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1./3. Perzentil von vier scheininfizierten Kontrolltieren und fünf BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.Ib: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 11 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	5,25	6,25	3,00	4,00	3,25	4,25	3,00	3,25	2,00	3,25
Percentil 25 (Kontrollen):	4,25	4,50	2,63	3,00	1,88	2,88	1,88	2,00	1,00	1,13
Percentil 50 (Kontrollen):	5,25	6,25	3,00	4,00	3,25	4,25	3,00	3,25	2,00	3,25
Percentil 75 (Kontrollen):	13,38	11,00	3,75	7,63	8,00	4,88	8,63	7,13	6,00	6,88
n (Kontrollen) = 4										
Median (BDV):	8,50	5,50	4,50	6,50	6,50	3,50	3,00	4,00	1,00	1,50
Percentil 25 (BDV):	5,00	3,75	4,25	5,25	3,00	2,75	1,00	2,75	1,00	1,25
Percentil 50 (BDV):	8,50	5,50	4,50	6,50	6,50	3,50	3,00	4,00	1,00	1,50
Percentil 75 (BDV):	11,75	11,00	6,75	7,00	6,75	5,50	5,75	5,75	3,25	2,75
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,624	0,902	0,018	0,264	0,537	0,537	0,617	0,805	0,686	0,387

Daten-Tabelle 4.2.3.1.Ib: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 11 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69)

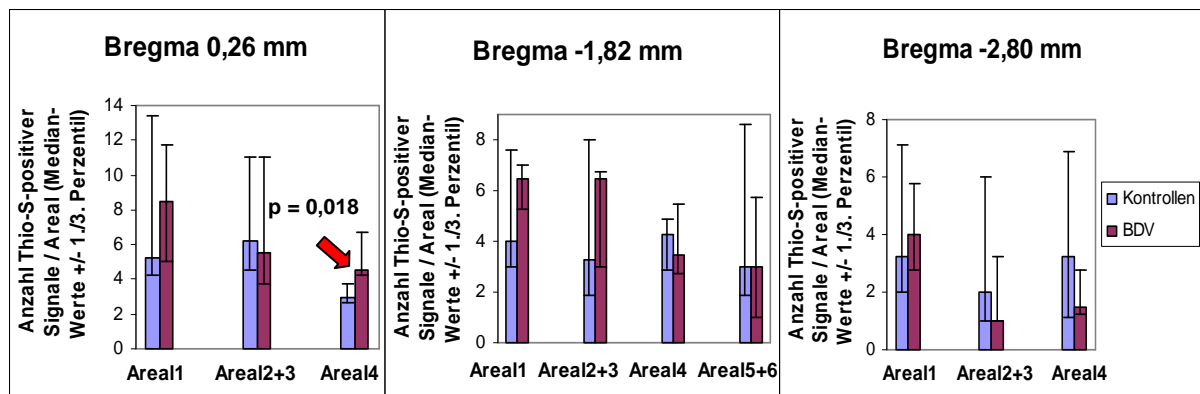


Abb. 4.2.3.1.Ib: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 11 Monate

In zahlreichen untersuchten Arealen wurden mehr Thio-S-positive, perivaskuläre β A-Signale bei den BDV-infizierten Tieren registriert als bei den nicht infizierten Kontrolltieren. In einem Areal zeigten die BDV-Tiere signifikant mehr gefäßständiges β -Amyloid als die Kontrolltiere (roter Pfeil). Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1./3. Perzentil von vier scheininfizierten Kontrolltieren und fünf BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.IIa: Median-Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β -Amyloid-Signale in drei untersuchten Hirnregionen zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 13,5 Monate; $p < 0,05$

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	12,00	11,50	1,50	22,50	25,00	36,00	20,50	25,00	31,50	24,50
Percentil 25 (Kontrollen):	9,25	9,00	0,75	14,50	22,75	24,25	8,25	18,50	18,50	10,75
Percentil 50 (Kontrollen):	12,00	11,50	1,50	22,50	25,00	36,00	20,50	25,00	31,50	24,50
Percentil 75 (Kontrollen):	25,25	16,25	3,00	38,00	43,00	40,25	30,75	46,75	49,25	29,75
n (Kontrollen) = 5										
Median (BDV):	15,50	7,00	1,50	13,00	17,00	18,50	7,50	25,00	17,50	19,50
Percentil 25 (BDV):	6,50	4,25	0,25	10,75	11,75	14,50	2,75	19,00	10,25	15,50
Percentil 50 (BDV):	15,50	7,00	1,50	13,00	17,00	18,50	7,50	25,00	17,50	19,50
Percentil 75 (BDV):	19,50	14,00	2,75	23,25	32,50	29,75	10,25	27,25	22,00	32,50
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,602	0,172	0,673	0,251	0,347	0,075	0,059	0,597	0,076	0,602

Daten-Tabelle 4.2.3.1.IIa: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 13,5 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69)

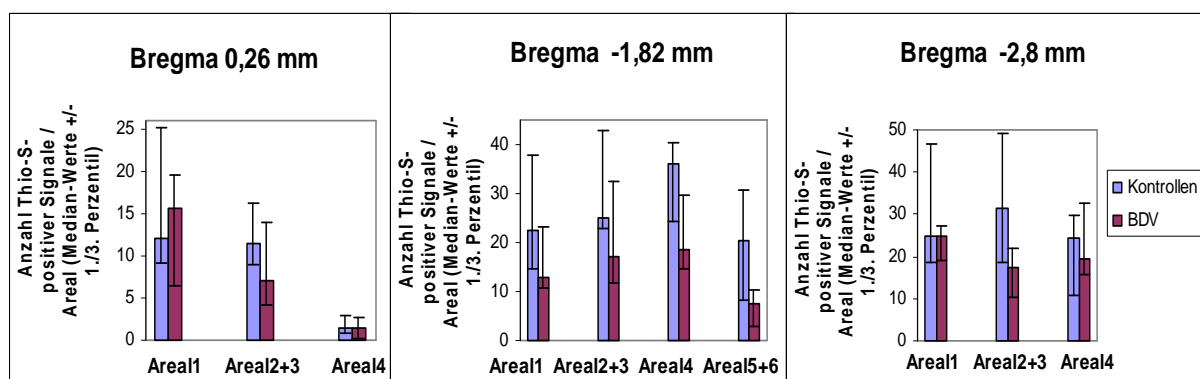


Abb. 4.2.3.1.IIa: Thioflavin-S-positiv, parenchymatöse β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 13,5 Monate

In den meisten untersuchten Hirnarealen fanden sich tendenziell weniger Thio-S positive, β -Amyloid-Signale in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere als in den entsprechenden Hirnregionen der Kontrolltiere. Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1./3. Perzentil von fünf scheininfizierten Kontrolltieren und fünf BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.IIb: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 13,5 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	6,50	8,50	4,00	3,50	5,00	4,00	3,00	1,50	2,00	2,00
Percentil 25 (Kontrollen):	5,25	6,00	2,75	3,00	4,00	2,25	1,50	1,25	1,00	1,75
Percentil 50 (Kontrollen):	6,50	8,50	4,00	3,50	5,00	4,00	3,00	1,50	2,00	2,00
Percentil 75 (Kontrollen):	9,00	9,50	5,25	4,75	5,50	6,50	5,00	4,25	3,50	2,75
n (Kontrollen) = 5										
Median (BDV):	6,50	9,50	5,00	6,00	7,50	5,50	4,50	8,50	6,00	3,00
Percentil 25 (BDV):	4,00	7,00	3,25	3,50	4,00	2,75	2,25	6,25	4,25	1,50
Percentil 50 (BDV):	6,50	9,50	5,00	6,00	7,50	5,50	4,50	8,50	6,00	3,00
Percentil 75 (BDV):	8,00	11,25	7,50	7,75	12,50	7,25	6,50	8,50	10,00	6,00
n (BDV) = 5										
U-Test:	0,916	0,243	0,292	0,207	0,344	0,754	0,344	0,015	0,016	0,168

Daten-Tabelle 4.2.3.1.IIb: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 13,5 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69)

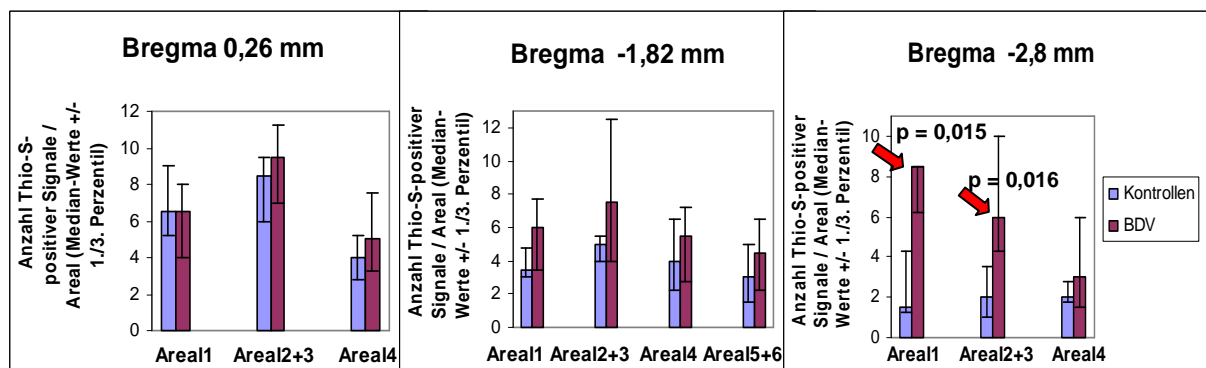


Abb. 4.2.3.1.IIb: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 13,5 Monate

In fast allen ausgewerteten Arealen wurden bei den BDV-infizierten Mäusen tendenziell mehr perivaskuläre β A-Ablagerungen registriert als in den entsprechenden Arealen der Kontrollmäuse. Signifikante Unterschiede sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet (siehe Bregma-Ebene -2,8 mm). Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1./3. Perzentil von fünf scheininfizierten Kontrolltieren und fünf BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Tab. 4.2.3.1.IIIa: Median-Vergleich der Thioflavin-S-positiven, parenchymatösen β -Amyloid-Signale in drei untersuchten Hirnregionen zwischen Kontroll- und BDV-Tieren in der Altersgruppe 18 Monate;
 $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	45,00	20,00	18,00	37,00	23,50	47,00	33,00	55,00	42,50	33,50
Percentil 25 (Kontrollen):	18,50	3,00	11,00	17,00	8,00	42,00	19,00	29,00	14,00	31,50
Percentil 50 (Kontrollen):	45,00	20,00	18,00	37,00	23,50	47,00	33,00	55,00	42,50	33,50
Percentil 75 (Kontrollen):	53,50	38,50	39,50	60,00	57,50	68,00	58,50	58,50	55,00	44,00
n (Kontrollen) = 3										
Median (BDV):	40,50	19,75	7,00	35,75	39,25	36,25	38,00	34,75	22,50	27,00
Percentil 25 (BDV):	28,13	8,50	4,38	27,25	16,00	27,88	34,13	31,50	21,75	21,38
Percentil 50 (BDV):	40,50	19,75	7,00	35,75	39,25	36,25	38,00	34,75	22,50	27,00
Percentil 75 (BDV):	55,88	30,25	9,38	46,63	53,25	41,00	43,13	48,50	27,25	43,50
n (BDV) = 6										
U-Test:	1,000	0,796	0,038	0,897	0,796	0,039	0,606	0,604	0,437	0,364

Daten-Tabelle 4.2.3.1.IIIa: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 18 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69)

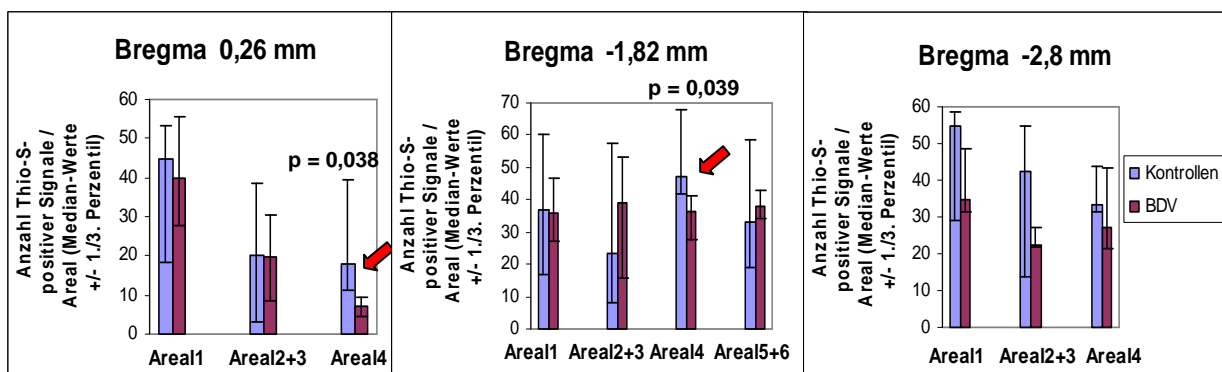


Abb. 4.2.3.1.IIIa: Thioflavin-S-positiv, parenchymatöse β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 18 Monate

In den meisten untersuchten Hirnarealen fanden sich tendenziell weniger Thio-S positive, parenchymatöse β -Amyloid-Signale in den Gehirnen der BDV-infizierten Tiere als in den entsprechenden Hirnregionen der Kontrolltiere. Signifikante Unterschiede sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Dargestellt sind die Medianwerte \pm 1./3. Perzentil von drei scheininfizierten Kontrolltieren und sechs BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Tab.. 4.2.3.1.IIIb: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 18 Monate; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

Tier-Nr.:	Bregma-Ebene 0,26 mm in %			Bregma-Ebene -1,82 mm in %				Bregma-Ebene -2,8 mm in %		
	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4	Areal 5+6	Areal 1	Areal 2+3	Areal 4
Median (Kontrollen):	9,50	13,50	3,50	7,50	6,00	5,00	3,50	8,00	5,00	6,50
Percentil 25 (Kontrollen):	8,00	10,00	2,50	7,50	3,50	4,50	2,00	5,00	4,00	3,00
Percentil 50 (Kontrollen):	9,50	13,50	3,50	7,50	6,00	5,00	3,50	8,00	5,00	6,50
Percentil 75 (Kontrollen):	19,50	24,50	4,50	9,50	10,00	10,00	4,00	9,00	9,00	8,00
n (Kontrollen) = 3										
Median (BDV):	19,00	14,25	7,25	11,50	11,75	8,00	6,00	10,75	8,75	4,75
Percentil 25 (BDV):	13,63	13,00	6,00	6,88	10,13	6,88	4,00	7,25	6,00	3,50
Percentil 50 (BDV):	19,00	14,25	7,25	11,50	11,75	8,00	6,00	10,75	8,75	4,75
Percentil 75 (BDV):	22,13	19,38	8,00	13,88	17,50	11,50	9,50	12,00	13,63	11,88
n (BDV) = 6										
U-Test:	0,302	0,515	0,027	0,294	0,038	0,193	0,036	0,197	0,364	0,795

Daten-Tabelle 4.2.3.1.IIIb: Auswertung der einzelnen Hirnareale der Altersgruppe 18 Monate (siehe Ergebnis-Teil, S. 69),

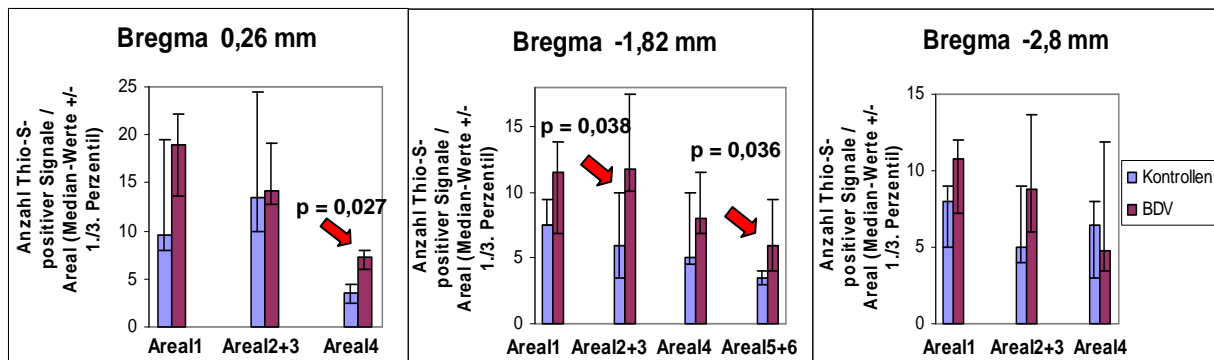


Abb. 4.2.3.1.IIIb: Thioflavin-S-positive, perivaskuläre β -Amyloid-Ablagerungen in drei untersuchten Hirnregionen bei Kontroll- und BDV-Mäusen in der Altersgruppe 18 Monate

In allen ausgewerteten Arealen – mit Ausnahme von Areal4 in der Hirnregion Bregma -2,8 mm – wurden bei den BDV-infizierten Mäusen tendenziell mehr perivaskuläre β A-Ablagerungen registriert als in den entsprechenden Arealen der Kontrollmäuse. In drei Arealen sind diese Unterschiede zwischen Kontroll- und BDV-Gruppe signifikant (rote Pfeile). Dargestellt sind die Medianwerte +/- 1/3. Perzentil von drei scheininfizierten Kontrolltieren und sechs BDV-infizierten Tieren; $p < 0,05$

Daten-Tabellen zu Punkt 4.2.4 ELISA auf S. 73

	β A1-40 in pg/mg FG		β A1-42 in pg/mg FG	
	Löslich	Unlöslich	Löslich	Unlöslich
Median Kontrollen:	350,00	909,00	397,00	450,00
Percentil 25 Kontrollen:	304,00	847,00	351,00	369,00
Percentil 75 Kontrollen:	382,00	915,00	412,00	465,00
n (Kontrollen) = 3				
Median BDV:	391,00	817,30	343,12	399,77
Percentil 25 BDV:	313,50	713,00	341,00	376,50
Percentil 75 BDV:	408,00	898,50	391,50	489,00
n (BDV) = 5				
U-Test:	0,297	0,180	0,101	0,881

Altersgruppe 11 Monate**Tab. 4.2.4.B: Vergleich der β -Amyloid1-40- und 1-42-Konzentration zwischen transgenen Kontroll- und BDV-Tieren der Altersgruppe 13,5 Monate**

Dargestellt sind die Medianwerte von vier scheininfizierten, transgenen Kontrollmäusen und fünf BDV-infizierten, transgenen Mäusen in pg/mg Feuchtgewicht Hirnmasse. Es wurden die SDS-lösliche und SDS-unlösliche, fibrilläre Fraktion der beiden β A-Peptide im Kortex und im Hippokampus untersucht. Mit Ausnahme des unlöslichen β A1-40-Peptids stets tendenziell weniger zerebrale β -Amyloid-Gehalte der BDV-infizierten Tiere gegenüber Kontrollen, in einem Fall Signifikanz; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

	β A1-40 in pg/mg FG		β A1-42 in pg/mg FG	
	Löslich	Unlöslich	Löslich	Unlöslich
Median Kontrollen:	497,00	747,50	484,00	436,00
Percentil 25 Kontrollen:	492,00	702,50	460,25	413,50
Percentil 75 Kontrollen:	505,75	782,00	507,75	451,75
n (Kontrollen) = 4				
Median BDV:	457,00	812,00	472,00	393,00
Percentil 25 BDV:	437,00	747,00	458,00	366,00
Percentil 75 BDV:	463,50	911,00	491,50	452,50
n (BDV) = 5				
U-Test:	0,014	0,086	0,806	0,221

Altersgruppe 13,5 Monate

Abb. 4.2.4.C: Vergleich der β -Amyloid₁₋₄₀- und ₁₋₄₂-Konzentration zwischen transgenen Kontroll- und BDV-Tieren der Altersgruppe 18 Monate

Dargestellt sind die Medianwerte von drei scheininfizierten, transgenen Kontrollmäusen und sechs BDV-infizierten, transgenen Mäusen in pg/mg Feuchtgewicht Hirnmasse. Es wurden die SDS-lösliche und SDS-unlösliche, fibrilläre Fraktion der beiden β A-Peptide im Kortex und im Hippokampus untersucht; $p < 0,05$ (rot unterlegt)

	β A1-40 in pg/mg FG		β A1-42 in pg/mg FG	
	Löslich	Unlöslich	Löslich	Unlöslich
Median Kontrollen:	6443,89	10965,46	1417,28	509,94
Percentil 25 Kontrollen:	4929,33	10403,04	869,42	249,22
Percentil 75 Kontrollen:	12831,98	11607,52	3382,43	641,37
n (Kontrollen) = 3				
Median BDV:	8133,51	12838,00	1599,47	523,58
Percentil 25 BDV:	4453,96	12261,77	940,86	410,11
Percentil 75 BDV:	10936,23	13792,57	2419,73	726,84
n (BDV) = 6				
U-Test:	1,000	0,020	0,796	1,000

Altersgruppe 18 Monate

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Seeger für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit am Veterinär-Anatomischen Institut anzufertigen, insbesondere auch für sein außerordentliches Engagement bei der Realisierung der finanziellen Unterstützung durch ein Stipendium, sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. T. Stahl für die hervorragende fachliche Beratung und Betreuung sowohl im theoretischen, wissenschaftlichen als auch im praktischen, medizinisch-labordiagnostischen Bereich, für wertvolle Diskussionen sowie für die geduldige Unterstützung insbesondere bei der Einweihung in die elektronisch-technischen Geheimnisse der Datenverarbeitung.

Allen Mitarbeitern des Veterinär-Anatomischen Instituts möchte ich für das freundliche Arbeitsklima danken; Herrn Dr. Kacza, Frau G. Lindner, Frau A. Schwarze und Frau H. Arnold danke ich für die großartige und geduldige Einarbeitung und technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. R. Schliebs danke ich für die Möglichkeit, zahlreiche labortechnische Untersuchungen und Dokumentationen am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung (PFI) durchführen zu können. Frau J. Apelt, Frau R. Jendrek, Herrn Dr. J. Grosche und Herrn Dr. S. Roßner aus dem PFI gilt mein Dank für die hervorragende technische Unterstützung und die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der RNase Protection Assays möchte ich Frau Dr. M. Hollborn aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde danken.

Stellvertretend möchte ich mich bei Frau S. Weisheit aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum (MEZ) für die gute Betreuung unserer Mäuse im Versuchstierstall bedanken.

Herrn A. Richter möchte ich ganz herzlich für die geduldige und unermüdliche Unterstützung in allen Fragen der statistischen Bearbeitung danken.

Meiner lieben Annemarie Wenzke danke ich für die wunderbare Unterbringung, Versorgung und Nervenstärke, insbesondere während der letzten Phase der Erstellung der Arbeit, und für ihre (Gast-) Freundschaft.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung, für ihre Liebe und ihr Vertrauen in mich, die mir vor allem in schwierigen Phasen Kraft und Rückhalt gaben.

Meinem Freund Florian danke ich für sein großes Verständnis, seine Geduld und seine bedingungslose Unterstützung meiner beruflichen Ziele. Ich danke ihm dafür, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht und mir durch seinen Optimismus Ansporn und Durchhaltevermögen vermittelt.